

Efeitos da exposição aguda à frutose em anéis isolados de aorta de ratos

Camila Almenara Cruz Pereira

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
Fisiologia Cardiovascular**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Vitória
2017**

Efeitos da exposição aguda à frutose em anéis isolados de aorta de ratos

Camila Almenara Cruz Pereira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Aprovada em 30/03/2017 por:

Prof^a Dr^a Alessandra S. Padilha– Orientadora,
UFES

Prof Dr Marcelo Perim Baldo, UNIMONTES

Prof^a Dr^a Ágata Lages Gava, UFES

Prof Dr Roger Lyrio dos Santos, UFES

Prof Dr Hélder Mauad, UFES

Coordenador do PPGCF: Prof^a Dr^a Alessandra S.
Padilha

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais e irmãos pela constante preocupação, apoio e exemplo, mesmo que muitas vezes eles não compreendam as minhas escolhas.

Ao Gilson, pela paciência e companheirismo. Seu senso crítico e perfeccionista me incentiva a sempre melhorar, em todos os sentidos.

À Alessandra, por ter me inserido na pesquisa desde a iniciação científica. Obrigada por ter acreditado no meu potencial desde o começo. Sua confiança e orientação foram, sem dúvidas, essenciais para a minha formação.

Ao Marcelo e Thaís pelo constante incentivo e orientação. Agradeço por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar, mesmo de longe. Muito obrigada pela confiança depositada em mim para executar esses projetos.

À Renata, pela amizade, apoio e todas as interrupções no laboratório.

Ao “Multidão de condroítes” por todas as discussões científicas ou não. Esse grupo tornou todo esse processo muito mais divertido e construtivo.

Aos demais alunos do LEMCRV por tornarem nosso ambiente de trabalho mais leve e pelas trocas de conhecimento.

Aos chefes do laboratório: Dalton, Ivanita, Leonardo e Paula. Obrigada pelo conhecimento compartilhado e por todas as críticas construtivas.

Ao professor Norbert Leitingger por me aceitar como aluna em seu laboratório permitindo que eu conhecesse um pouco de como a pesquisa é feita nos EUA.

Ao Vlad, por me ajudar nas análises da respiração mitocondrial.

Aos demais colegas de trabalho na Universidade da Virginia por toda a paciência, ótimo convívio e inestimável aprendizagem.

À CAPES, FAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu, é sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.

Ana Vilena, *Trem-Bala*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Frutose	20
1.1.1. Consumo de frutose	20
1.1.2. Metabolismo da Frutose	21
1.1.3. Efeitos da frutose sobre os sistemas orgânicos	24
1.1.4. Efeitos da frutose sobre o sistema cardiovascular	25
2. OBJETIVOS	28
2.1. Objetivo Geral	28
2.2. Objetivos Específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Animais Experimentais	28
3.2. Obtenção Dos Anéis Isolados De Aorta Torácica	29
3.2.1. Avaliação da integridade funcional dos segmentos de aorta torácica	30
3.3. Protocolos Experimentais de reatividade vascular	32
3.3.1. Curva dose-resposta à frutose	32
3.3.2. Exposição à frutose	32
3.3.3. Efeito da exposição <i>in vitro</i> à frutose sobre a contração induzida pela fenilefrina	33
3.3.4. Efeito da exposição à frutose sobre o relaxamento dependente do endotélio	33
3.3.5. Efeito da exposição à frutose sobre o relaxamento independente do endotélio	34
3.3.6. Estudo da participação dos fatores endoteliais nas alterações vasculares mediadas pela exposição à frutose	34
3.3.7.1. Influência da exposição <i>in vitro</i> à frutose sobre a via do óxido nítrico	35
3.3.7.2. Envolvimento de radicais livres nas alterações da função vascular após exposição à frutose	35
3.3.7.3. Participação da via da angiotensina II na alteração das respostas vasculares induzidas pela frutose	36
3.3.7.4. Participação da via dos prostanóides derivados da COX nas reatividade vascular de anéis de aorta expostos à frutose	36
3.4. Análise do estresse mitocondrial de células endoteliais após sobrecarga com frutose	36

3.4.1. Cultura de células endoteliais	36
3.4.2. Análise do estresse mitocondrial	37
3.5. Expressão dos resultados e análise estatística	39
3.6. Fármacos e reagentes utilizados	39
4. RESULTADOS	42
4.1. Frutose aumenta a reatividade vascular a fenilefrina de maneira dose-dependente	42
4.2. Sobrecarga de frutose altera a contração e relaxamento de artérias de condutância	44
4.3. análise das vias de agentes vasotivos na resposta contrátil de artérias expostas à frutose	45
4.3.1. Participação do endotélio e da via do NO no aumento da resposta contrátil induzido pela frutose	45
4.3.2. Envolvimento de EROs na resposta contrátil de aorta exposta à frutose	47
4.3.3. Participação da via da COX nas alterações vasculares induzidas pela sobrecarga aguda com frutose	48
4.4. análise das vias de agentes vasotivos no relaxamento dependente do endotélio de artérias expostas à frutose.	50
4.4.1. Frutose altera a modulação do vasorelaxamento por ação das EROs	50
4.4.2. Influência da via da COX no relaxamento mediado pelo endotélio na sobrecarga com frutose	52
4.4.3. Participação da via da angiotensina II no relaxamento de artérias expostas à frutose	53
4.5. efeitos da sobrecarga de frutose sobre a respiração de células endoteliais	55
5. DISCUSSÃO	56
5.1. Efeitos da frutose sobre a contratilidade de artérias é dose-dependente	56
5.2. Sobrecarga com frutose induz disfunção endotelial em artérias de condutância	58
5.3. Fatores endoteliais envolvidos no efeito da frutose sobre as respostas vasomotoras	60
5.3.1. Efeitos da sobrecarga de frutose sobre a via do óxido nítrico	61

5.3.2. Participação das espécies reativas de oxigênio na reatividade vascular de aorta exposta à frutose	61
5.3.3. A modulação da vasomotricidade pela angiotensina II não foi alterada após sobrecarga com frutose	64
5.3.4. A sobrecarga de frutose não afeta a modulação das respostas vasomotoras pela via da ciclooxigenase	64
5.4. Metabolismo da frutose Em células endoteliais	67
5.5. Comparação com os efeitos da dieta crônica com frutose	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS	71
8. ANEXO	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. OSMOLARIDADE DAS SOLUÇÕES NUTRIDORAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MANITOL E FRUTOSE.....	34
TABELA 2. RESPOSTA MÁXIMA (RMAX) E SENSIBILIDADE (PD2) DAS CURVAS CONCENTRAÇÃO RESPOSTA À FENILEFRINA, ACETILCOLINA E NITROPRUSSATO DE SÓDIO (NPS) APÓS EXPOSIÇÃO À FRUTOSE OU MANITOL.....	46
TABELA 3. EFEITOS DA REMOÇÃO DO ENDOTÉLIO (E-), L-NAME, SOD, CATALASE, APOCININA E INDOMETACINA NA RESPOSTA MÁXIMA (RMAX) E SENSIBILIDADE (PD2) À FENILEFRINA DE AORTA INCUBADA COM FRUTOSE OU MANITOL.	50
TABELA 4. EFEITOS DA SOD, CATALASE, APOCININA, INDOMETACINA E LOSARTAN NAS RESPOSTAS VASCULARES À ACETILCOLINA DE AORTAS EXPOSTA AO MANITOL E À FRUTOSE.	55

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** PRINCIPAIS VIAS DO METABOLISMO HEPÁTICO DA FRUTOSE E GLICOSE. OS DOIS AÇÚCARES CONVERGEM ÀS TRIOSES DIIDROXIACETONA-FOSFATO (DHAP) E GLICERALDEÍDO-3-P (GA-3-P). A CONVERSÃO DA FRUTOSE ÀS TRIOSES É UNIDIRECIONAL MAS A FRUTOSE-1-P ATIVA A GLICOQUINASE E ESTIMULA A GLICOGENEOGÊNESE. A PRINCIPAL VIA DE CONVERSÃO DA FRUTOSE ESTÁ INDICADA PELAS SETAS AZUIS QUE CULMINAM NA GLICOSE-6-FOSTATO, QUE É CONVERTIDA À GLICOSE OU INCORPORADA AO GLICOGÊNIO. (ADAPTADO DE FEINMAN E FINE, 2013)22
- FIGURA 2.** CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS É CONSTITUÍDA POR UMA SÉRIE DE TRANSPORTADORES, ANCORADOS NA MEMBRANA INTERNA MITOCONDRIAL, QUE ENCAMINHA ELÉTRONS PROVENIENTES DE NADH E FADH₂ PARA O O₂. NESSE PROCESSO, PRÓTONS SÃO BOMBEADOS DA MATRIZ MITOCONDRIAL PARA O ESPAÇO INTERMEMBRANAS E O O₂ É REDUZIDO À H₂O. O GRADIENTE DE PRÓTONS É USADO PELA ATP SINTASE PARA SÍNTESE DE ATP. (ADAPTADO DE "OXIDATIVE PHOSPHORYLATION - BIOLOGY - OPENSTAX CNX", [S.D.]) 23
- FIGURA 3.** (A) AORTA TORÁCICA IMERSA EM UMA PLACA DE PETRI CONTENDO SOLUÇÃO DE KREBS, ANTES DA MANIPULAÇÃO PARA RETIRADA DO TECIDO CONECTIVO E ADIPOSEO; (B) APÓS A RETIRADA DOS TECIDOS E SENDO DIVIDIDA EM SEGMENTOS CILÍNDRICOS ENTRE 3-4 MM (ANGELI, 2009). 29
- FIGURA 4.** PREPARAÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA PARA AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR "IN VITRO". SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS BIOPAC SYSTEMS (MODIFICADO DE DIAS, 2007). 30
- FIGURA 5.** REGISTRO COM CURVAS REPRESENTANDO O TESTE DA VIABILIDADE DO MÚSCULO LISO VASCULAR COM KCL E AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE FUNCIONAL DO ENDOTÉLIO. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DO MÚSCULO LISO VASCULAR COM KCL: (A) PERÍODO DE ESTABILIZAÇÃO INICIAL (45 MIN PERMANECENDO NA TENSÃO DE 0.9 A1,3 G); (B) ADIÇÃO DE KCL (75 MM) AO BANHO; (C) LAVAGEM DOS ANÉIS COM SOLUÇÃO KREBS-HENSELEIT; (D) PERÍODO DE ESTABILIZAÇÃO (30 MIN); (E) ADIÇÃO DE KCL (75 MM) AO BANHO; (F) PLATÔ DA CONTRAÇÃO INDUZIDA PELO KCL (75 MM); (G) LAVAGEM DOS ANÉIS COM SOLUÇÃO KREBS-HENSELEIT; (H) PERÍODO DE ESTABILIZAÇÃO (30 MIN). AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE FUNCIONAL DO ENDOTÉLIO: (I) PRÉ-CONTRAÇÃO COM FENILEFRINA (FE) 10⁻⁶M; (J) PLATÔ DA CONTRAÇÃO INDUZIDA PELA FE; (L) ADIÇÃO DE ACETILCOLINA (ACH) 10⁻⁵M. O TEMPO FOI REGISTRADO EM MINUTOS, EIXO HORIZONTAL (INTERVALO DE 80 MIN) E A FORÇA EM GRAMAS (G), EIXO VERTICAL. (MODIFICADO DE DIAS, 2007). 31

- FIGURA 6.** ESQUEMA DEMONSTRATIVO DOS PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS. INCUBAÇÃO COM O FÁRMACO A SER ESTUDADO E DEPOIS DE TRINTA MINUTOS REALIZOU-SE A CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA À FE (10^{-10} A 3×10^{-4} M) (ANGELI, 2009). 35
- FIGURA 7.** (A) LOCAL DE AÇÃO DAS DROGAS UTILIZADAS NA ANÁLISE DA FUNÇÃO MITOCONDRIAL. (B) PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA ANÁLISE DA RESPIRAÇÃO MITOCONDRIAL UTILIZANDO A TÉCNICA DE SEAHORSE. A RESPIRAÇÃO BASAL DAS CÉLULAS É DETERMINADA PELO CONSUMO DE OXIGÊNIO EM CONDIÇÕES BASAIS. A INCUBAÇÃO COM OLIGOMICINA LEVA À INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ATP, PERMITINDO APENAS O VAZAMENTO DE PRÓTONS POR DIFUSÃO FACILITADA. BAM15A PERMITE O RETORNO NOS PRÓTONS PARA A MITOCÔNDRIA, DETERMINANDO A RESPIRAÇÃO MÁXIMA E A INCUBAÇÃO COM ROTEDONA E ANTIMICINA A IMPEDE O TRANSPORTE DE ELÉTRONS ATRAVÉS DA MEMBRANA, INTERROMPENDO TODO O CONSUMO DE OXIGÊNIO PELA MITOCÔNDRIA. OCR: TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO. 38
- FIGURA 8.** CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA À FENILEFRINA DE ANÉIS DE AORTA EXPOSTOS A 0, 4, 20 E 40 MM DE FRUTOSE (A) OU MANITOL (B). ÁREAS ABAIXO DAS CURVAS (AUC) DOSE-RESPOSTA À FENILEFRINA APÓS EXPOSIÇÃO À FRUTOSE (C) E MANITOL (D). A MAGNITUDE DO EFEITO DA FRUTOSE EXCLUINDO SEU EFEITO OSMÓTICO ESTÁ REPRESENTADA PELA DIFERENÇA DA ÁREA ABAIXO DA CURVA (DAUC) DE CADA CONCENTRAÇÃO USADA DE MANITOL E FRUTOSE (E). ANOVA UMA VIA, *POS HOC* DE TUKEY, * $P < 0,05$ VS FRUTOSE 0 E 4 MM. 43
- FIGURA 9.** CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA À FENILEFRINA (A), ACETILCOLINA (B) E NITROPRUSSATO DE SÓDIO (NPS) (C) DE SEGUIMENTOS DE AORTA EXPOSTOS À FRUTOSE OU MANITOL. TESTE T-STUDENT, * $P < 0,05$ VS MANITOL. NÚMERO DE ANIMAIS USADOS EM CADA PROTOCOLO MOSTRADO ENTRE PARÊNTESES. 44
- FIGURA 10.** CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA À FENILEFRINA APÓS REMOÇÃO DO ENDOTÉLIO (A, B) E INIBIÇÃO DA NO SINTASE PELO L-NAME (D, E) NA PRESENÇA DE MANITOL (A, D) OU FRUTOSE (B, E). A DIFERENÇA DA ÁREA ABAIXO DA CURVA (DAUC) APÓS REMOÇÃO DO ENDOTÉLIO (C) E INCUBAÇÃO COM L-NAME (F). TESTE DE T-STUDENT, * $P < 0,05$ VS E+ OU SEM DROGA, ^A $P < 0,05$ VS MANITOL. NÚMERO DE ANIMAIS USADOS EM CADA PROTOCOLO MOSTRADO ENTRE PARÊNTESES. E-: SEGMENTOS DE AORTA APÓS REMOÇÃO MECÂNICA DO ENDOTÉLIO; E+: SEGMENTOS DE AORTA COM ENDOTÉLIO INTACTO; %DAUC: PORCENTAGEM DA DIFERENÇA DA ÁREA ABAIXO DA CURVA. 46
- FIGURA 11.** CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA À FENILEFRINA APÓS INCUBAÇÃO COM SOD (A, B), CATALASE (CAT, D, E) E APOCININA (APO, G, H) EM SEGMENTOS DE AORTA

EXPOSTOS AO MANITOL (A, D, G) E À FRUTOSE (B, E, H). PORCENTAGEM DA DIFERENÇA DAS ÁREAS ABAIXO DAS CURVAS (%DAUC) NA PRESENÇA DE SOD (C), CATALASE (F) E APOCININA (I). TESTE DE T-STUDENT, *P < 0,05 VS SEM DROGA, ^AP < 0,05 VS MANITOL. NÚMERO DE ANIMAIS USADOS EM CADA PROTOCOLO MOSTRADO ENTRE PARÊNTESES. 48

FIGURA 12. CURVAS CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA À FENILEFRINA DE AORTA EXPOSTA AO MANITOL (A) OU À FRUTOSE (B) NA PRESENÇA OU NÃO DE INDOMETACINA (INDO). ÁREAS ABAIXO DAS CURVAS APÓS BLOQUEIO DA COX PELA INDOMETACINA (C). NÚMERO DE ANIMAIS USADOS EM CADA PROTOCOLO MOSTRADO ENTRE PARÊNTESES. %DAUC: PORCENTAGEM DA DIFERENÇA DA ÁREA ABAIXO DA CURVA. 49

FIGURA 13. PARTICIPAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (A, B) E DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (D, E) NO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO EM AORTAS EXPOSTAS AO MANITOL (A, D) E À FRUTOSE (B, E). PORCENTAGEM DA DIFERENÇA DA ÁREA ABAIXO DA CURVA NAS RESPOSTAS À ACETILCOLINA APÓS INCUBAÇÃO COM APOCININA (C) E ALOPURINOL (F). TESTE DE T-STUDENT, * P < 0,05 VS SEM DROGA, A P < 0,05 VS MANITOL. NÚMERO DE ANIMAIS USADOS EM CADA PROTOCOLO MOSTRADO ENTRE PARÊNTESES. SOD: SUPERÓXIDO DISMUTASE, VARREDOR ENZIMÁTICO DE ÂNION SUPERÓXIDO; CAT: CATALASE, VARREDOR ENZIMÁTICO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO..... 51

FIGURA 15. EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM INDOMETACINA NO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO APÓS EXPOSIÇÃO AO MANITOL (A) E À FRUTOSE (B). PORCENTAGEM DA DIFERENÇA DA ÁREA ABAIXO DA CURVA (%DAUC) NAS RESPOSTAS À ACETILCOLINA APÓS INCUBAÇÃO COM INDOMETACINA. NÚMERO DE ANIMAIS USADOS EM CADA PROTOCOLO MOSTRADO ENTRE PARÊNTESES. INDO: INDOMETACINA, INIBIDOR DA ENZIMA CICLOOXYGENASE. 53

FIGURA 16. EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM LOSARTAN NO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO APÓS EXPOSIÇÃO AO MANITOL (A) E À FRUTOSE (B). PORCENTAGEM DA DIFERENÇA DA ÁREA ABAIXO DA CURVA (%DAUC) NAS RESPOSTAS À ACETILCOLINA APÓS INCUBAÇÃO COM LOSARTAN. NÚMERO DE ANIMAIS USADOS EM CADA PROTOCOLO MOSTRADO ENTRE PARÊNTESES. LOS: LOSARTAN, ANTAGONISTA DE RECEPTOR AT1. 54

FIGURA 17. ANÁLISE DO CONSUMO DE OXIGÊNIO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE ARTÉRIAS CORONÁRIAS HUMANAS APÓS INCUBAÇÃO COM FRUTOSE (1 OU 10 MM) OU VEÍCULO (FRUTOSE 0 MM). (I) RESPIRAÇÃO BASAL; (II) RESPIRAÇÃO BASAL COM FRUTOSE OU VEÍCULO; (III) VAZAMENTO DE ELÉTRONS; (IV) CAPACIDADE RESPIRATÓRIA MÁXIMA; (V)

CONSUMO DE OXIGÊNIO EXTRA-MITOCONDRIAL. OCR: TAXA DE CONSUMO DE OXIGÊNIO.....	55
---	----

FIGURA 18. FATORES VASODILATADORES PRODUZIDOS PELO ENDOTÉLIO VASCULAR. SÃO TRÊS AS PRINCIPAIS VIAS ENDOTELIAIS QUE GERAM A VASODILATAÇÃO: A VIA DA PROSTACICLINA (PGI ₂), A VIA DE PRODUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO) PELA ENZIMA ENOS, E A VIA DO FATOR HIPERPOLARIZANTE DERIVADO DO ENDOTÉLIO (EDHF). DEPENDENDO DO TIPO DE VASO, TODAS ESTAS VIAS PODEM SER ATIVADAS APÓS A ESTIMULAÇÃO DE RECEPTORES DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS EM CUJA VIA DE SINALIZAÇÃO OCORRA O AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO INTRACELULAR DO CA ²⁺ . DENTRE OS AGONISTAS PODE-SE CITAR A ACETILCOLINA (ACH), SUBSTÂNCIA P (SP), BRADICININA (BK), E ADENOSINA TRIFOSFATO (ATP). APÓS A LIBERAÇÃO PELAS CÉLULAS ENDOTELIAIS, ESTES MEDIADORES EXERCEM SUAS AÇÕES NAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS, ATRAVÉS DA PRODUÇÃO DOS SEGUNDO MENSAGEIROS AMPC OU GMPc, OU AINDA ATRAVÉS DA HIPERPOLARIZAÇÃO. (MODIFICADO DE RATTMANN, 2009).....	59
---	----

FIGURA 19. METABOLISMO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO E FORMAÇÃO DE PROSTANÓIDES PELA AÇÃO DAS CICLOOXIGENASES (COX-1 E COX-2). OS PROSTANÓIDES AGEM EM RECEPTORES PREFERENCIAIS E SEUS SUBTIPOS ESTÃO IDENTIFICADOS: IP, DPS, EPS, FP E TP PARA PROSTACICLINA (PGI ₂), PROSTAGLANDINA D ₂ (PGD ₂), PROSTAGLANDINA E ₂ (PGE ₂), PROSTAGLANDINA F _{2A} (PGF _{2A}) E TROMBOXANO (TXA ₂), RESPECTIVAMENTE. PGIS: PROSTACICLINA SINTASE; TXS: TROMBOXANO SINTASE; PGHS: PROSTAGLANDINA H SINTASE; PGDS: PROSTAGLANDINA D SINTASE; PGFS: PROSTAGLANDINA F SINTASE; CPGES: PROSTAGLANDINA E SINTASE CITOSÓLICA; MPGES: PROSTAGLANDINA E SINTASE DA MEMBRANA. (EXTRAÍDO DE FÉLÉTOU ET AL, 2011).....	66
--	----

FIGURA 20. RESUMO GRÁFICO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO IN VITRO À FRUTOSE SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA ISOLADA.	70
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

1,4,5 – inositol trifosfato (IP_3)

3,5 – monofosfato cíclico de guanosina (GMPc)

5'-trifosfato de adenosina (ATP)

Acetilcolina (ACh)

Adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH)

Ânion superóxido (O^{2-})

Áreas abaixo da curva (AUC)

Apocinina (Apo)

Catalase (Cat)

Ciclooxigenase (COX)

Cloreto de potássio (KCl)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenadoria de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (CAPES)

Diacilglicerol (DAG)

Diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC)

Endotélio íntegro (E^+)

Endotélio removido mecanicamente (E^-)

Enzima conversora de angiotensina (ECA)

Enzima fosfolipase A_2 (PLA_2)

Erro padrão da média (EPM)

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF)

Flavina adenina dinucleotídeo (FAD)

Inibidor não-seletivo da NOS, o N^G -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Sintase de óxido nítrico (NOS)

Indometacina (Indo)

Isoforma endotelial da sintase de óxido nítrico (eNOS)

Losartan (Los)

Nitroprussiato de sódio (NPS).

Óxido nítrico (NO)

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2),

Prostaciclina (PGI_2)

Prostaglandina E_2 (PGE_2)

Prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PG F}_{2\alpha}$)

Prostaglandina H_2 (PGH_2)

Proteína quinase G (PKG)

Receptor de angiotensina do subtipo 1 (AT_1)

Resposta máxima ($R_{\text{máx}}$)

Sensibilidade (pD_2)

Sistema renina angiotensina (SRA)

Superóxido dismutase (SOD)

Taxa de consumo de oxigênio (OCR)

Transportador para glicose tipo 2 (GLUT-2)

Transportador para glicose tipo 5 (GLUT-5)

Tromboxano (TXA_2)

RESUMO

Já foi descrito que a frutose pode interferir de maneira aguda na função cardiovascular em humanos e modelos animais, mas os mecanismos envolvidos nesse efeito ainda não foram elucidados. Assim, nós investigamos se a frutose pode afetar a função vascular sem a interferência do efeito de seu metabolismo hepático. Segmentos de aorta de ratos Wistar foram incubados com 4, 20 ou 40 mM frutose ou manitol por 30 minutos e as respostas vasculares à agentes vasoativos foram analisados. Nós também analisamos o consumo de oxigênio por células endoteliais cultivadas em meio acrescido de frutose (1 e 10 mM). A frutose aumentou a resposta máxima à fenilefrina de maneira dose-dependente. Além disso, reduziu o relaxamento dependente do endotélio induzido pela acetilcolina sem alterar as respostas ao nitroprussiato de sódio. A frutose também reduziu as respostas contráteis após remoção do endotélio e incubação com L-NAME. A adição de SOD e apocinina aumentou a resposta à acetilcolina apenas em artérias expostas à frutose. Além disso, a frutose causou maior redução da resposta contrátil induzida pela fenilefrina após incubação com SOD, apocinina e catalase, quando comparado ao manitol. Ainda, a catalase reduziu a resposta à acetilcolina apenas em aortas expostas ao manitol. Por fim, a adição de frutose não afetou a taxa de consumo basal de oxigênio, o vazamento de prótons pela membrana e a capacidade respiratória máxima de células endoteliais. Nossos resultados demonstraram que a exposição aguda à frutose induz estresse oxidativo por aumento da ativação da NADPH oxidase, que aumentou a produção de ânion superóxido e, conseqüentemente, a degradação de NO. Além disso, o aumento da ação vasoconstritora do peróxido de hidrogênio pode contribuir para a exacerbada resposta contrátil. Esse desequilíbrio da ação de agentes vasoativos pode ser o

principal mecanismo pelo qual a frutose induz respostas vasoconstritoras agudas e pode explicar as alterações vasculares observadas após a ingestão de frutose.

Palavras-chave: Frutose, estresse oxidativo, NADPH oxidase, disfunção endotelial

ABSTRACT

It has been already described that fructose can acutely interfere on cardiovascular function in humans and in animals, but the mechanisms underlying this effect remain unclear. Thus, we sought to test whether fructose can affect the vascular function without the interference of its metabolic effect. We exposed aortic segments from Wistar rats to 4, 20 or 40 mM of fructose or mannitol for 30 minutes and then evaluated the vascular responses to vasoactive agents. We also analyzed oxygen consumption by cultured endothelial cells after fructose supplementation (1 and 10 mM). Fructose increased the response to phenylephrine and reduced endothelium dependent relaxation elicited by acetylcholine, but did not change vascular responses to sodium nitroprusside. Fructose also reduced the contractile responses to phenylephrine of endothelium denuded and L-NAME incubated aorta. SOD and apocynin increased the response to acetylcholine only on fructose exposed-vessels. Additionally, SOD, apocynin and catalase reduced the contractile response induced by phenylephrine more in fructose exposed-aortic rings. Moreover, catalase reduced vascular response to acetylcholine only on mannitol-exposed aorta. Finally, fructose addition did not affect the basal oxygen consumption rate, the proton leakage and the maximal respiratory capacity on endothelial cells. Our results demonstrated that acute fructose exposure increases superoxide anion produced by NADPH oxidase and, consequently, increases NO degradation. Also, the enhanced vasoconstrictor action of hydrogen peroxide might contribute to exacerbated contractile responses. This vasoactive imbalance might be the key role by which fructose induces an acute vasoconstrictor response and can explain the vascular alterations observed after fructose ingestion.

Keywords: Fructose, oxidative stress, NADPH oxidase, endothelial dysfunction.

1. INTRODUÇÃO

1.1. FRUTOSE

Frutose é um monossacarídeo naturalmente encontrado em frutas, geralmente associado à glicose. Por seu poderoso efeito adoçante, a frutose tem sido usada para adoçar bebidas industrializadas e cereais (HANOVER; WHITE, 1993). Uma porção de 330 ml de refrigerante, por exemplo, pode conter aproximadamente 40 g de açúcar e destes, 20 g de frutose (DOUARD; FERRARIS, 2013). Após o desenvolvimento do xarope de milho com alta concentração de frutose, o consumo deste açúcar aumentou consideravelmente (WHITE, 2013) e despertou o interesse da comunidade científica para a análise dos efeitos da frutose sobre o organismo.

1.1.1. Consumo de frutose

Os humanos são adaptados a uma dieta de baixa frutose, uma vez que até a revolução industrial, comidas ricas em frutose, como frutas e mel, eram consumidas apenas ocasionalmente (DOUARD; FERRARIS, 2013). No século XIX, com o aumento do fornecimento de produtos derivados da cana-de-açúcar, proveniente de plantações no Caribe; e a descoberta de novas fontes de açúcar, como a beterraba; houve um aumento do consumo de açúcar. De fato, os preços do açúcar caíram drasticamente com o início da produção em escala industrial de xarope de milho com alta concentração de frutose (HANOVER; WHITE, 1993).

O xarope de milho com alta concentração de frutose foi introduzido na indústria alimentícia no final da década de 1960 como uma alternativa à sacarose. Nas décadas seguintes houve um aumento expressivo do consumo de frutose, chegando no ano de 1999 a números comparáveis à sacarose. De fato, o xarope de milho apresentava vantagens em relação à sacarose quanto ao custo de produção e maior facilidade de manuseio em algumas aplicações e poder edulcorante, além de apresentar mesma composição energética que a sacarose (WHITE, 2013). Isso contribuiu para que o consumo de frutose nos Estados Unidos chegasse a 180 g/pessoa, tendo jovens com idade entre 15 a 22 anos como maiores consumidores de frutose (DOUARD; FERRARIS, 2013).

O alto consumo de frutose chamou atenção da comunidade científica, que passou então a estudar os efeitos desse açúcar sobre o organismo. Estudos clínicos e experimentais têm relatado que a ingestão crônica e excessiva de frutose leva ao desenvolvimento de fatores de risco cardiovasculares e metabólicos similares aos da síndrome metabólica, incluindo hiperglicemia, resistência insulínica, hipertrigliceridemia e obesidade (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004; CHICCO et al., 1994; HWANG et al., 1987).

1.1.2. Metabolismo da Frutose

Após ingerida, a frutose é encaminhada ao intestino delgado, onde é absorvida por difusão facilitada, sendo GLUT-5 e GLUT-2 os principais transportadores para frutose. Da luz do intestino, a frutose é conduzida para o citoplasma dos enterócitos via GLUT-5, presente na membrana apical destas células. O transporte da frutose do citoplasma dos enterócitos para o sangue ocorre através do GLUT-2 (THORENS; MUECKLER, 2010).

Quando a concentração de frutose na luz intestinal é baixa (< 1 mM), até 60% da frutose é convertida à glicose ainda nos enterócitos (BISMUT; HERS; VAN SCHAFTINGEN, 1993). Esta conversão leva à redução do conteúdo intracelular de frutose, o que mantém a concentração de frutose no meio intracelular menor do que na luz intestinal, permitindo que toda a frutose ingerida seja absorvida (DOUARD; FERRARIS, 2013). Já na alta ingestão de frutose, grande parte dessa é absorvida para a circulação, sendo metabolizada, principalmente no fígado (SCHAEFER; GLEASON; DANSINGER, 2009). O metabolismo hepático da frutose contribui para ao menos 50% do total, mas outros órgãos como intestino, rins e músculo também podem processar a frutose (FEINMAN; FINE, 2013). A entrada de frutose nos hepatócitos, assim como nas células musculares e nas células do túbulo proximal renal, ocorre através do GLUT-2, e dispensa a ação da insulina (DOUARD; FERRARIS, 2013).

Em condições normais, cerca de 30 a 50% da frutose ingerida é convertida à glicose (SUN; EMPIE, 2012). Se consumida em alta quantidade, a frutose também estimula a produção de glicogênio (PETERSEN et al., 2001), mas a principal preocupação do metabolismo da frutose envolve a síntese de triglicerídeos, acetil-CoA e a lipogênese (FEINMAN; FINE, 2013).

da mitocôndria, dirigindo os elétrons para a ubiquinona, e desta para o complexo III. O FADH_2 cede elétrons para o complexo II mitocondrial que, através da ubiquinona, cede elétrons para o complexo III. Do complexo III, os elétrons são encaminhados para o citocromo C e, em seguida, para complexo IV. O O_2 recebe então os elétrons, sendo reduzido à H_2O . Esse fluxo de elétrons através dos complexos mitocondriais ocorre com o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembranas. A membrana interna da mitocôndria é altamente seletiva à passagem de íons e mantém esse gradiente de prótons. O retorno desses prótons para a matriz mitocondrial ocorre por canais específicos localizados na membrana interna da mitocôndria e gera a chamada força próton-motora. Esses canais que permitem o retorno de prótons para a matriz são acoplados a ATP sintase, que utiliza a força próton-motora para catalisar a fosforilação do ADP, formando ATP (MURRAY et al., 2013) (Figura 2).

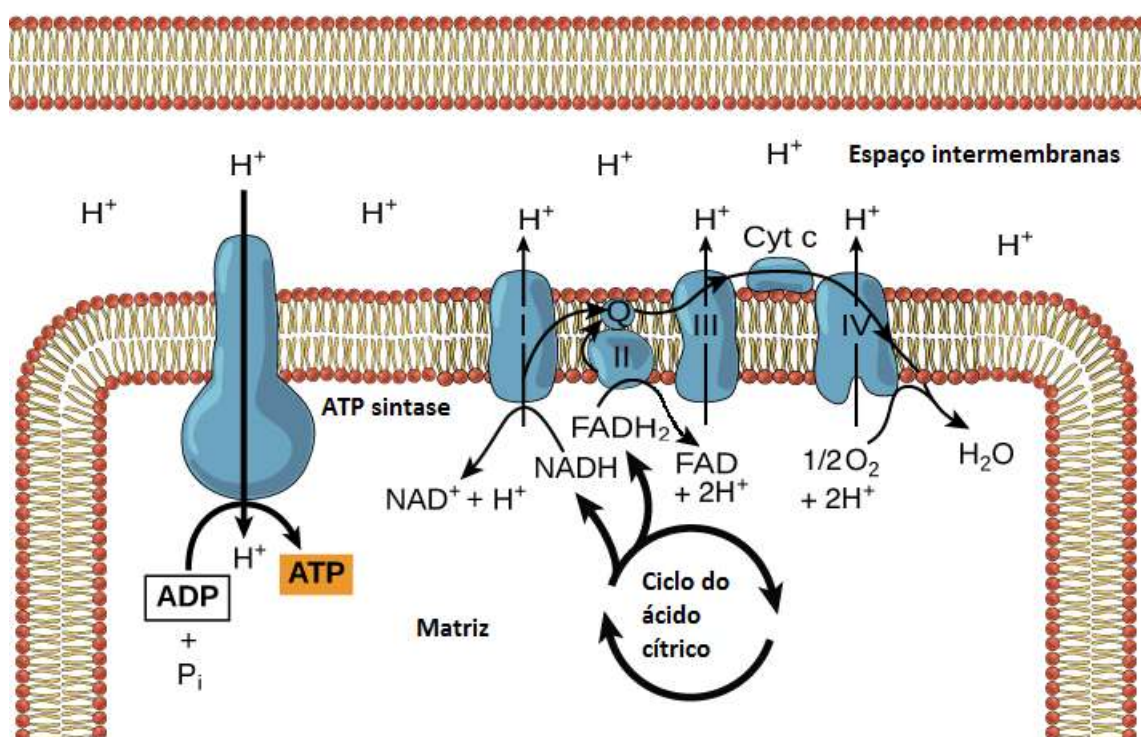


Figura 2. Cadeia transportadora de elétrons é constituída por uma série de transportadores, ancorados na membrana interna mitocondrial, que encaminha elétrons provenientes de NADH e FADH_2 para o O_2 . Nesse processo, prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas e o O_2 é reduzido à H_2O . O gradiente de prótons é usado pela ATP sintase para síntese de ATP. (Adaptado de "Oxidative Phosphorylation - Biology - OpenStax CNX", [s.d.])

A cadeia respiratória mitocondrial é a principal via responsável pela formação de energia na forma de ATP e disfunções dessa via têm sido observadas em diversas

doenças metabólicas como obesidade e diabetes (BALLINGER et al., 2002). Na hiperglicemia crônica, a cadeia fosforilativa encontra-se demasiadamente ativada, com excesso do transporte de elétrons pelos complexos presentes na membrana interna da mitocôndria. Esses elétrons são capturados pelo oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) que contribuem para a disfunção endotelial, evento fortemente envolvido no desenvolvimento de doenças cardiovasculares no diabetes (BERTOLUCI et al., 2015).

Assim, mesmo que ainda não tenha sido relatado efeitos de baixas quantidades de frutose sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios, a ingestão de elevadas quantidades de frutose tem sido associada a alterações metabólicas caracterizadas por resistência à insulina, hipertensão arterial, dislipidemias, acúmulo de gordura visceral e obesidade (VARTANIAN; SCHWARTZ; BROWNELL, 2007; WHITE, 2013).

1.1.3. Efeitos da frutose sobre os sistemas orgânicos

Como mencionado anteriormente, o metabolismo da frutose pode ser direcionado para a formação de triglicerídeos, assim, o consumo de frutose tem sido associado ao aumento da concentração plasmática de triglicerídeo e aumento da conversão à lipídios no fígado, sugerindo que a lipogênese é um importante processo bioquímico induzido pela frutose (OUYANG et al., 2008). O alto consumo de frutose gera substrato para lipogênese *de novo*, aumenta a síntese de VLDL e reduz a oxidação lipídica no fígado (DORNAS et al., 2015), propiciando o desenvolvimento de esteatose hepática não-alcoólica. Essa deposição ectópica de lipídios pode levar a uma maior fosforilação de receptores de insulina (IRS-1), resultando em resistência à insulina (SHULMAN, 2000). De fato, estudos clínicos demonstraram que pacientes sob dieta rica em frutose apresentaram maiores níveis séricos de triglicerídeos (ASSY et al., 2008; LE et al., 2009; LÊ et al., 2006; TEFF et al., 2004), muitas vezes acompanhado de aumentada resistência à insulina (ASSY et al., 2008; LE et al., 2009).

O efeito lipogênico da frutose também já foi detectado após curto período de tempo. Park e colaboradores demonstraram os efeitos da ingestão de bebidas contendo glicose e/ou frutose sobre a lipogênese. Os autores observaram um aumento da lipogênese a medida que se aumentava o conteúdo de frutose na bebida em relação ao conteúdo de glicose. Foi relatado aumento na trigliceridemia

imediatamente após a ingestão da bebida com frutose e após a refeição subsequente (PARKS et al., 2008). Resultados similares demonstraram que bebidas adoçadas com frutose aumentaram agudamente (até 24 horas) os níveis sanguíneos de triglicérides em homens e mulheres obesas (TEFF et al., 2009). Também foi sugerida uma associação entre consumo crônico de altas quantidades de frutose, hipertrigliceridemia e aumento do risco de doenças cardiovasculares (SWARBRICK et al., 2008).

Diversos estudos com humanos demonstram que a frutose pode induzir hiperuricemia (EMMERSON, 1974; FOX; KELLEY, 1972; TURNER et al., 1979). A etapa inicial do metabolismo da frutose, sua fosforilação à frutose-1-P, ocorre com hidrólise do ATP, gerando AMP e ácido úrico (KURTZ et al., 1986). Essa alta quantidade de ácido úrico pode promover danos oxidativos como proliferação de células musculares lisas e endoteliais, liberação de substâncias pró-inflamatórias e redução da biodisponibilidade de NO (DORNAS et al., 2015). Isso explica como a hiperuricemia pode mediar as alterações cardiovasculares observadas em indivíduos sob dieta rica em frutose.

1.1.4. Efeitos da frutose sobre o sistema cardiovascular

Apesar dos avanços da medicina e da quantidade de fármacos disponíveis, as doenças cardiovasculares ainda são a principal causa de morte natural, representando em 2013 aproximadamente 31% da mortalidade total (GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS et al., 2015). Nos Estados Unidos, a prevalência de doenças cardiovasculares soma 85,6 milhões de pessoas, o que corresponde a mais de um terço da população norte-americana (MOZAFFARIAN et al., 2016). No Brasil, em 2007, 29,4% dos óbitos foram decorrentes de doenças cardiovasculares (VI Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial). Países de média e baixa renda registram 80% das mortes causadas por doenças cardiovasculares. As causas dessas doenças são multifatoriais, envolvendo fatores genéticos, fatores biológicos, como hipertensão, obesidade e diabetes; e fatores comportamentais como o sedentarismo, tabagismo e dieta (MOZAFFARIAN et al., 2016).

Vários estudos experimentais têm relatado os efeitos da frutose sobre o sistema cardiovascular, sendo o aumento da pressão arterial constantemente relatado após dieta crônica rica em frutose (DAI; MCNEILL, 1995; EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; HWANG et al., 1987; PUYÓ et al., 2009). Os mecanismos que têm sido propostos para explicar como a frutose aumenta a pressão arterial incluem o aumento da atividade simpática, a reação inflamatória, ativação neuro-humoral e a disfunção endotelial (JALAL et al., 2010; YANAI et al., 2008). De fato, o consumo prolongado de frutose leva à hiperglicemia crônica, o que tem sido reportado como o maior indutor das complicações vasculares no diabetes, essas são responsáveis por grande parte das desordens e alta mortalidade de pacientes diabéticos (SEMCHYSHYN, 2013).

Esses efeitos cardiometabólicos induzidos pela frutose dependem do tempo de exposição e da quantidade de frutose ingerida cronicamente. No entanto, Endo e colaboradores (2014) descreveram um efeito agudo da ingestão de frutose sobre a pressão arterial em humanos. Nesse estudo, uma solução de frutose (50 g) foi fornecida à indivíduos adultos e parâmetros cardiovasculares foram analisados durante os 120 minutos pós-ingestão. A ingestão de frutose aumentou a pressão arterial média de forma instantânea e sustentada durante, pelo menos, 2 horas. Também foi observado aumento da frequência cardíaca e do débito cardíaco, além de redução da condutância das artérias braquial e poplítea (ENDO et al., 2014). Esses resultados corroboram os achados de Brown e colaboradores, que relataram aumento da pressão arterial em homens jovens vinte minutos após ingestão de 60g de frutose, também associado ao aumento do débito cardíaco (BROWN et al., 2008). Efeitos agudos da frutose também foram descritos em animais experimentais por alguns autores. Moreno e Hong demonstraram que uma única dose oral de frutose (5 g/kg) foi capaz de aumentar a pressão arterial de ratos, e que a incubação de anéis de aorta com frutose durante 4 horas reduziu o relaxamento dependente do endotélio (MORENO; HONG, 2013). A redução do relaxamento dependente do endotélio também foi observada em leito mesentérico após infusão com frutose (RICHEY et al., 1997). Em adição, Peredo e colaboradores (2006) associaram a atenuação do relaxamento induzida pela frutose com um menor efeito vasodilatador da prostaciclina em aorta e leito mesentérico expostos à frutose (PEREDO et al., 2006). Esses estudos sugerem que a frutose exerce efeito deletério ao sistema cardiovascular tendo o endotélio como principal alvo de sua ação.

O endotélio é constituído por uma única camada de células epiteliais pavimentosas. Durante muito tempo se pensou que o endotélio servia apenas de barreira entre o sangue e a camada média do músculo liso vascular. Somente em 1977, foi relatada a primeira indicação de que o endotélio possuía fundamental importância no controle do tônus vascular, por meio da produção de substâncias vasoativas (MONCADA et al., 1977). Atualmente, sabe-se que as células endoteliais sintetizam e liberam fatores que regulam a angiogênese, as respostas inflamatórias e o tônus vascular. É responsável também pela manutenção do balanço entre a promoção e a inibição da proliferação e migração das células do músculo liso vascular, além de prevenir a agregação plaquetária e a trombose (FÉLÉTOU; VANHOUTTE, 2009). Os principais fatores relaxantes provenientes do endotélio são: óxido nítrico (NO), fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (FURCHGOTT, 1983) e a prostaciclina (MONCADA et al., 1977). Dentre os fatores contráteis, os principais são: a angiotensina II (SKEGGS et al., 1954), endotelina-1 (ET-1) (YANAGISAWA et al., 1988), ânion superóxido (RUBANYI; VANHOUTTE, 1986) e derivados da via do ácido araquidônico, como o tromboxano (TXA₂) e as prostaglandinas H₂ e F_{2α} (PGH₂ e PG F_{2α}) (FRÖLICH; FÖRSTERMANN, 1989). Um desequilíbrio na síntese e liberação desses agentes vasoativos pode alterar o controle do tônus vascular contribuindo para o acometimento de doenças cardiovasculares. Os estudos experimentais que analisam o efeito agudo da frutose sobre o sistema cardiovascular fornecem indícios de que a frutose exerce um efeito imediato e direto sobre a função vascular. Entretanto, os mecanismos pelos quais a frutose promove esta disfunção vascular ainda não foram elucidados. Neste estudo, nós investigamos se a frutose é capaz de afetar a função endotelial, sem a interferência dos efeitos elicitados pelo seu metabolismo hepático após ingestão crônica desse açúcar, como a hipertrigliceridemia, pressão arterial aumentada e deposição de gordura visceral.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar os efeitos agudos da frutose sobre a função vascular, sem interferência das implicações de seu metabolismo massivo observado após dieta crônica com frutose.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as alterações das respostas vasculares promovidas pela exposição aguda à frutose;
- Identificar as vias de agentes vasoativos afetadas pela exposição aguda à frutose;
- Definir se a frutose afeta a função mitocondrial de células endoteliais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), machos, com aproximadamente 12 semanas de idade, pesando entre 250 e 300 g, cedidos pelo biotério do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo - UFES. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob condições controladas de temperatura (25° C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e à ração.

O uso e cuidado desses animais experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos da pesquisa com animais, e os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação e Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES- CEUA 06/2014).

3.2. OBTENÇÃO DOS ANÉIS ISOLADOS DE AORTA TORÁCICA

Os animais foram anestesiados com uma mistura anestésica, contendo quetamina e xilasina nas doses de 90 e 10 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal. Após atestada a ação anestésica, os animais foram eutanasiados e exangüinados. A aorta torácica descendente foi cuidadosamente removida e imersa rapidamente em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Henseleit resfriada, composta por (em mM): NaCl 118; KCl 4,7; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; NaHCO_3 23; Glicose 11; EDTA 0,01, aerada com mistura carbogênica contendo 5% de CO_2 e 95% de O_2 , mantendo o pH em 7,4.

Após a retirada do tecido conectivo e adiposo, a aorta torácica foi dividida em oito segmentos cilíndricos de aproximadamente 4 mm de comprimento (Figura 3). Alguns desses anéis tiveram o endotélio removido mecanicamente passando um fio de aço inoxidável na luz do vaso e friccionando contra a parede interna deste.



Figura 3. Aorta torácica imersa em uma placa de Petri contendo solução de Krebs, antes da manipulação para retirada do tecido conectivo e adiposo (esquerda); após a retirada dos tecidos e sendo dividida em segmentos cilíndricos entre 3-4 mm (direita) (Angeli, 2009).

Cada anel vascular foi colocado em cubas contendo 5 ml de solução de Krebs-Henseleit aquecida a $36 \pm 0,5$ °C, continuamente gaseificada com mistura carbogênica, mantendo o pH estável em 7,4. Dois fios de aço inoxidável, em forma de triângulos, foram passados através do lúmen dos segmentos de forma que ficassem

paralelos na luz do vaso. Um dos triângulos metálicos foi fixado à parede do banho e o outro conectado verticalmente a um transdutor de tensão isométrica. Assim, qualquer alteração de tensão exercida pelo vaso, na tentativa de modificar seu diâmetro interno, era captada pelo transdutor de força (TSD 125) conectado a um sistema de aquisição de dados (MP 100 Biopac Systems, Inc; Santa Bárbara, CA-USA) e este a um computador (Figura 4).

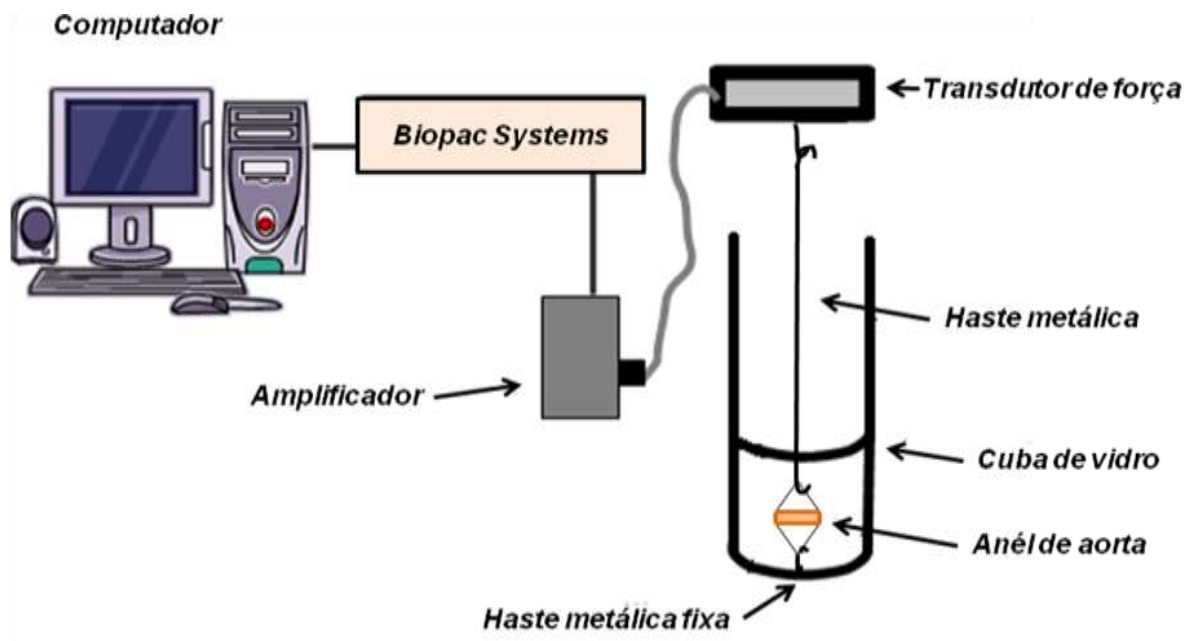


Figura 4. Preparação dos anéis isolados de aorta para avaliação da reatividade vascular “*in vitro*”. Sistema de aquisição de dados *Biopac Systems* (modificado de Dias, 2007).

Após a montagem, os anéis aórticos foram submetidos a uma tensão de repouso entre 0.9 a 1.1 g, reajustada, quando necessário, durante 45 minutos de estabilização (Figura 5 A).

3.2.1. Avaliação da integridade funcional dos segmentos de aorta torácica

Após o período de 45 minutos de estabilização (Figura 5A), uma dose de KCl 75 mM foi adicionada ao banho para verificar a atividade contrátil do músculo liso vascular induzida por despolarização. Após atingirem um aumento de um grama de

força a partir do valor basal, estes anéis eram lavados com solução de Krebs-Henseleit até que a tensão retornasse ao valor de repouso (Figura 5 B, C). Os anéis que não obtiveram tal contração foram descartados. Após 30 minutos de estabilização (Figura 5 D), uma nova dose de KCl (75 mM) era adicionada ao banho para a indução de uma contração máxima do músculo liso vascular, aferida após 30 minutos da adição, quando a tensão se estabiliza em um platô (Figura 5 E, F). Neste momento, os anéis foram novamente lavados três vezes para a remoção do excesso de KCl e a tensão voltar ao valor basal (1.0 grama) e, após 30 minutos (Figura 5 G, H), esses anéis foram submetidos à avaliação da integridade funcional do endotélio.

A função endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico, acetilcolina. Para tal, os anéis de aorta foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez estabilizada a tensão de contração, uma dose única de acetilcolina (10^{-5} M) foi aplicada (Figura 5 I, J, L). Os anéis com endotélio íntegro que apresentaram relaxamento induzido pela acetilcolina inferior a 85% em relação a pré-contração induzida pela fenilefrina eram descartados. Os anéis que tiveram o endotélio removido mecanicamente relaxaram no máximo 10% ou até contraíram após a incubação com acetilcolina.

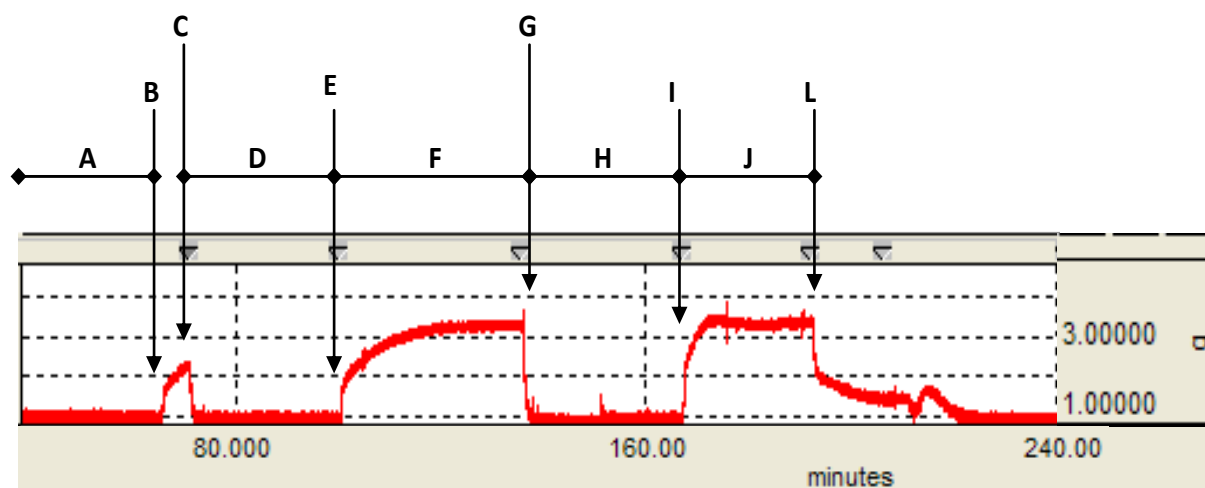


Figura 5. Registro com curvas representando o teste da viabilidade do músculo liso vascular com KCl e avaliação da integridade funcional do endotélio. Avaliação da viabilidade do músculo liso vascular com KCl: (A) Período de estabilização inicial (45 min permanecendo na tensão de 0.9 a 1,3 g); (B) Adição de KCl (75 mM) ao banho; (C) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; (D) Período de estabilização (30 min); (E) Adição de KCl (75 mM) ao banho; (F) Platô da contração induzida pelo KCl (75 mM); (G) Lavagem dos anéis com solução Krebs-Henseleit; (H) Período de estabilização (30 min). Avaliação da integridade funcional do endotélio: (I) Pré-contração com fenilefrina (Fe) 10^{-6} M; (J) Platô da contração induzida pela Fe; (L) Adição de acetilcolina (ACh) 10^{-5} M. O tempo foi registrado em minutos, eixo horizontal (intervalo de 80 min) e a força em gramas (g), eixo vertical. (modificado de Dias, 2007).

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS DE REATIVIDADE VASCULAR

3.3.1. Curva dose-resposta à frutose

Para análise da resposta vascular frente a diferentes concentrações de frutose, cada segmento de aorta de cada rato foi exposto a uma concentração diferente de frutose. Assim, após atestada a integridade muscular e endotelial, os anéis foram estabilizados em tensão entre 0,9 - 1,1 g durante 15 minutos e, então, uma solução de frutose foi adicionada ao banho. Cada segmento de aorta foi exposto a uma concentração diferente de frutose (0; 4; 20 e 40 mM) durante 45 minutos antes de se iniciar a curva concentração-resposta à fenilefrina. Para mimetizar o efeito osmótico exercido pela incubação da sobrecarga de frutose, as mesmas concentrações de manitol (0; 4; 20 e 40mM) foram adicionadas ao banho de outros segmentos aórticos do mesmo animal durante o mesmo período de tempo.

3.3.2. Exposição à frutose

Ao final do teste do endotélio, a solução de Krebs foi trocada 3 vezes novamente e foi esperado período de estabilização de 15 minutos. Neste momento, a solução da cuba foi novamente substituída 3 vezes por uma solução de Krebs-Henseleit acrescida de 40 mM de frutose ou manitol. Assim como na análise da curva dose-resposta à frutose, metade do número dos anéis viáveis de cada animal eram expostos à frutose e a outra metade era exposta à igual concentração de manitol. Neste momento também era feita a incubação com os fármacos.

A determinação da concentração de frutose utilizada neste estudo foi baseada em estudos anteriores dos efeitos da sobrecarga de frutose sobre a reatividade vascular (MORENO; HONG, 2013; PEREDO et al., 2006; RICHEY et al., 1997), e nos resultados obtidos na análise da curva dose-reposta à frutose, descrita no item 3.3.1.

A osmolaridade das soluções utilizadas neste estudo foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Osmolaridade} = \sum(nEq \times C) / V$$

Onde, n_{Eq} corresponde ao número de partículas osmoticamente ativas de um soluto; C é o valor da concentração em mol/l daquele soluto na solução; e V é o volume da solução em litros.

Como a frutose e o manitol apresentam apenas uma partícula osmoticamente ativa por molécula, a adição de frutose ou manitol, na mesma concentração, aumentou a osmolaridade da solução de maneira semelhante (Tabela 1).

Tabela 1. Osmolaridade das soluções nutritivas com diferentes concentrações de manitol e frutose.

Solução	Concentração	Osmolaridade
Krebs-Henseleit	0	315,2 mOsm
Krebs-	4 mM	319,2 mOsm
Henseleit + Manitol	20 mM	335,2 mOsm
	40 mM	355,2 mOsm
Krebs-Henseleit	4 mM	319,2 mOsm
+ Frutose	20 mM	335,2 mOsm
	40 mM	355,2 mOsm

3.3.3. Efeito da exposição in vitro à frutose sobre a contração induzida pela fenilefrina

Após 30 minutos de incubação com fármacos, era realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) de maneira cumulativa nos dois grupos estudados.

3.3.4. Efeito da exposição à frutose sobre o relaxamento dependente do endotélio

A função vasodilatadora endotelial foi avaliada através do relaxamento induzido pelo agonista muscarínico acetilcolina (ACh). Para tal, após incubação com frutose ou manitol por 30 minutos, os anéis de aorta com endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M. Uma vez obtido o platô, foram realizadas as curvas concentração-resposta, cumulativas à acetilcolina (10^{-11} a $3 \cdot 10^{-5}$ M).

3.3.5. Efeito da exposição à frutose sobre o relaxamento independente do endotélio

A avaliação da vasodilatação não mediada pelo endotélio foi analisada através do relaxamento induzido pelo nitroprussiato de sódio (NPS). Assim como para acetilcolina, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 10^{-6} M e, a seguir, foram realizadas curvas concentração-resposta a esse agonista em concentrações de 10^{-11} a $3 \cdot 10^{-5}$ M.

3.3.6. Estudo da participação dos fatores endoteliais nas alterações vasculares mediadas pela exposição à frutose

Todos os protocolos de reatividade vascular, a partir deste momento, foram realizados da seguinte forma: após o teste do endotélio e dos 30 minutos de estabilização da preparação, o fármaco era incubado por trinta minutos juntamente com a frutose ou manitol e, logo após, realizada a curva concentração-resposta à fenilefrina (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Figura 6) ou a pré-contracção com fenilefrina para posterior realização da curva concentração-resposta à acetilcolina. Neste estudo, foram incubados separadamente os seguintes fármacos: L-NAME (N^G -nitro-L-arginina metil éster), SOD (superóxido dismutase), catalase, apocinina, losartan, indometacina.

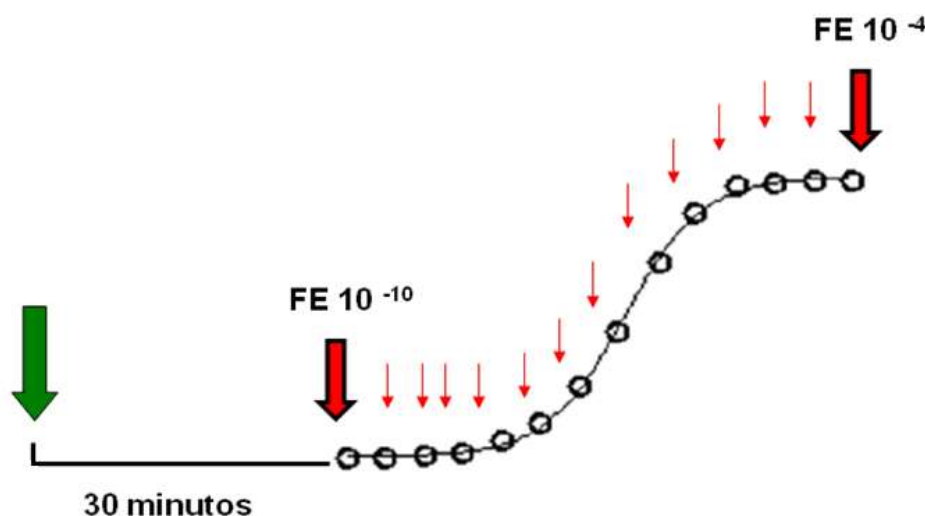


Figura 6. Esquema demonstrativo dos protocolos experimentais. Incubação com o fármaco a ser estudado e depois de trinta minutos realizou-se a curva concentração-resposta à FE (10^{-10} a 3×10^{-4} M) (Angeli, 2009).

3.3.7.1. Influência da exposição *in vitro* à frutose sobre a via do óxido nítrico

Com a finalidade de estudar a participação do óxido nítrico (NO) na resposta contrátil à fenilefrina após exposição à frutose, os anéis de aorta foram incubados com um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS), o *N*^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 100 μ M).

3.3.7.2. Envolvimento de radicais livres nas alterações da função vascular após exposição à frutose

A participação de EROs nas respostas vasculares após exposição à frutose foi avaliada através da incubação de varredores enzimáticos de: ânion superóxido, SOD (superóxido dismutase de eritrócitos bovinos, 150 U/ml, SIGMA); e peróxido de hidrogênio, catalase (catalase de fígado bovino, 1000 U/ml, SIGMA). Para avaliar a possível fonte dessas EROs, foi utilizado o inibidor da NADPH oxidase, apocinina (30 μ M, SIGMA).

3.3.7.3. Participação da via da angiotensina II na alteração das respostas vasculares induzidas pela frutose

Buscando averiguar uma possível participação da via da angiotensina II local na reatividade vascular à acetilcolina de anéis aórticos expostas à frutose, foi utilizado o antagonista de receptor AT₁, losartan (10 µM).

3.3.7.4. Participação da via dos prostanóides derivados da COX nas reatividade vascular de anéis de aorta expostos à frutose

Para avaliar a influência da via da ciclooxigenase nas respostas vasculares à fenilefrina e acetilcolina durante incubação com frutose, foi adicionado à solução um inibidor não-seletivo da COX, indometacina (10 µM, SIGMA).

3.4. ANÁLISE DO ESTRESSE MITOCONDRIAL DE CÉLULAS ENDOTELIAIS APÓS SOBRECARGA COM FRUTOSE

Para analisar se a sobrecarga de frutose afeta a atividade mitocondrial de células endoteliais, foi medido o consumo de oxigênio por células endoteliais na presença de frutose, em diferentes concentrações, em condições basais e após inibição dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Esses experimentos foram realizados no laboratório do Prof Norbert Leintinger, do Departamento de Farmacologia da Universidade da Virginia, durante período de estágio de doutorado sanduiche.

3.4.1. Cultura de células endoteliais

Células endoteliais primárias extraídas de artérias coronárias humanas foram cultivadas em meio EBM2 (LONZA) suplementado com fator de crescimento epidermal humano combinado, fator humano de crescimento de células endoteliais, ácido ascórbico, hidrocortisona, fator de crescimento similar à insulina, heparina, 2% soro fetal bovino, gentamicina e anfotericina. As células eram mantidas em frascos de 75 cm² em incubadoras a 37° C, 95% de umidade e 10% de CO₂. A cada 3 dias, as

células eram descoladas dos frascos usando solução contendo 0,25% de tripsina e eram semeadas em novos frascos. No dia do experimento, 30.000 células eram transferidas para cada poço de uma microplaca de 24 poços (XF24, BIOSCIENCE). Era esperada aproximadamente uma hora e 30 minutos, para as células se fixarem no fundo dos poços. O meio EBM2, era substituída por uma solução específica para o ensaio, meio para ensaio XF (BIOSCIENCE), com pH ajustado entre 7-7.2.

3.4.2. Análise do estresse mitocondrial

Portas de injeções foram carregadas com componentes que seriam injetados durante o ensaio. A placa contendo as células era colocada no aparelho Seahorse (XF24-3/FluxPalSeaHorse, BIOSCIENCE), juntamente com a microplaca contendo as portas de injeção. Medidas da concentração de O₂ são feitas por eletrodos a cada 10 minutos em cada poço da microplaca, sendo expressas como taxa de consumo de O₂ (OCR).

Após estabilização das células (30 minutos) com registro das medidas basais, foi feita a injeção de frutose em diferentes concentrações (0, 1 e 10 mM) a cada 4 micropoços e novas medidas de O₂ e CO₂ foram realizadas. Passados 30 minutos da injeção de frutose, foi injetada oligomicina A (1 µg/ml), um inibidor da ATP sintase da membrana interna mitocondrial. A inibição da ATP sintase reduz o fluxo de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, mas não impede o vazamento de prótons que ocorre por difusão facilitada. Uma nova injeção foi feita, agora com BAM15A (1 µM), um fármaco que cria poros na membrana interna da mitocôndria, permitindo a entrada de prótons a favor do gradiente, sem produção de ATP. A incubação com BAM15A permite a determinação da máxima respiração celular. Por fim, as células foram incubadas com rotedona (0.1 µM) e antimicina A (2 µM), que inibem a transferência de elétrons do complexo I para a ubiquinona e a oxidação da ubiquinona, respectivamente, resultando na interrupção da transferência de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial. A consequência dessa incubação final é a interrupção de todo o consumo de oxigênio pela mitocôndria (Figura 7).

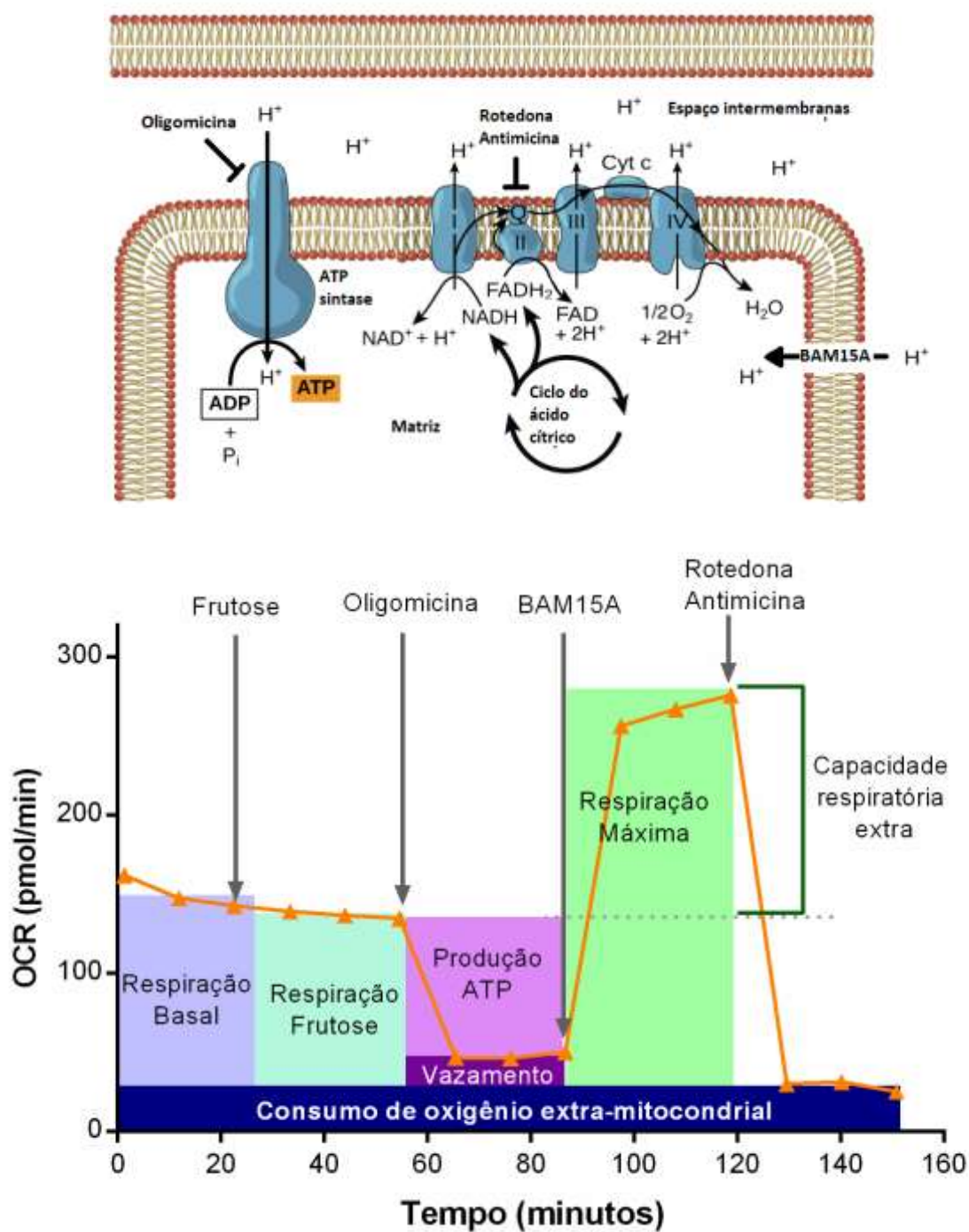


Figura 7. Local de ação das drogas utilizadas na análise da função mitocondrial (superior). Protocolo experimental para análise da respiração mitocondrial utilizando a técnica de SeaHorse. A respiração basal das células é determinada pelo consumo de oxigênio em condições basais. A incubação com oligomicina leva à inibição da produção de ATP. BAM15A permite o retorno nos prótons para a mitocôndria, determinando a respiração máxima e a incubação com rotedona e antimicina A impede o transporte de elétrons através da membrana, interrompendo todo o consumo de oxigênio pela mitocôndria (inferior). OCR: Taxa de consumo de oxigênio.

3.5. EXPRESSÃO DOS RESULTADOS E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os valores de n significam o número de animais utilizados em cada grupo experimental.

Os resultados de reatividade vascular das curvas concentração-resposta à fenilefrina foram normalizados em função da resposta máxima de contração ao KCl (75 mM) e estão expressas em porcentagem. As respostas de relaxamento dependente e independente do endotélio, induzidas pela acetilcolina e nitroprussiato de sódio, respectivamente, foram expressas em porcentagem de relaxamento em relação à pré-contracção obtida pela fenilefrina (10^{-6} M).

Para a determinação dos valores de resposta máxima ($R_{\text{máx}}$) e pD_2 ($-\log EC_{50}$, concentração de fenilefrina que produz 50% da resposta máxima), em resposta aos diferentes agonistas utilizados, foi realizada uma análise de regressão não-linear, obtida através da análise das curvas concentração-resposta utilizando-se GraphPrism Software (San Diego, CA, USA).

Com a finalidade de comparar a magnitude de efeito dos fármacos sobre a resposta contrátil à fenilefrina dos grupos estudados, alguns resultados foram expressos como diferenças das áreas abaixo das curvas (dAUC) de concentração-resposta à fenilefrina. A AUC foi calculada para cada curva concentração-resposta e a diferença está expressa como porcentagem da diferença da AUC (dAUC%) da curva controle correspondente (a curva obtida do mesmo grupo experimental, sem incubação de drogas bloqueadoras das vias dos agentes vasoativos).

A análise estatística dos resultados foi realizada por teste *t* de *Student* não-pareado, análise de variância (ANOVA) uma via para medidas repetidas. Para analisar as diferenças individuais na análise de variância era realizado o *pos-hoc* de Tukey, utilizando-se GraphPrism Software (San Diego, CA, USA). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $p < 0,05$.

3.6. FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

- Acetilcolina, cloridrato (Sigma)

- Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) (Merck)
- Anfotericina B (Sigma)
- Antimicina A (Sigma)
- Apocinina (Acetovanilona) (Sigma)
- BAM15A (Sigma)
- Bicarbonato de sódio (Vetec)
- Catalase (Catalase extraída de fígado bovino) (Sigma)
- Cloreto de cálcio diidratado (Merck)
- Cloreto de potássio (Merck)
- Cloreto de sódio (Merck)
- Fator de crescimento similar à insulina (Sigma)
- Fosfato de potássio monobásico (Merck)
- Frutose (Wow nutrition)
- Gentamicina (Sigma)
- Glicose (Merck)
- Heparina (Sigma)
- Hidrocortisona (Sigma)
- Indometacina (Sigma)
- L-Fenilefrina, hidrocloreto (Sigma)
- Losartan (Sigma)
- Manitol (solução aquosa 20%) (HalexIstar)
- Meio de cultura EBM2 (Lonza)
- Meio de cultura DMEM (Lanza)
- Meio para ensaio XF (Bioscience)
- N^ω-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (Sigma)

- Nitroprussiato de sódio, diidratado (Sigma)
- Oligomicina (Sigma)
- Rotedona (Sigma)
- Soro fetal bovino (Thermo Fisher Scientific)
- Superóxido dismutase de eritrócito bovino (SOD) (Sigma)
- Sulfato de magnésio heptahidratado (Merk)
- Tripsina (Sigma)

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada e mantidas no congelador a -20° C.

4. RESULTADOS

4.1. FRUTOSE AUMENTA A REATIVIDADE VASCULAR A FENILEFRINA DE MANEIRA DOSE-DEPENDENTE

As respostas contráteis de anéis de aorta expostos a diferentes concentrações de frutose ou manitol (0, 4, 20 e 40 mM) foram analisadas. Foi observado aumento progressivo da resposta contrátil à fenilefrina à medida que se aumentava a concentração de frutose (Figura A, C, E). Entretanto somente na concentração de 40 mM foi observada diferença estatística em relação à resposta máxima à fenilefrina de anéis de aorta expostos à 0 e 4 mM de frutose (Figura 8 A, C). Esse resultado sugere uma relação dose-dependente do aumento da contratilidade induzido pela frutose. Já o aumento da concentração de manitol não alterou as respostas contráteis induzidas pelo agonista α_1 -adrenérgico (Figura 8 B, D, E).

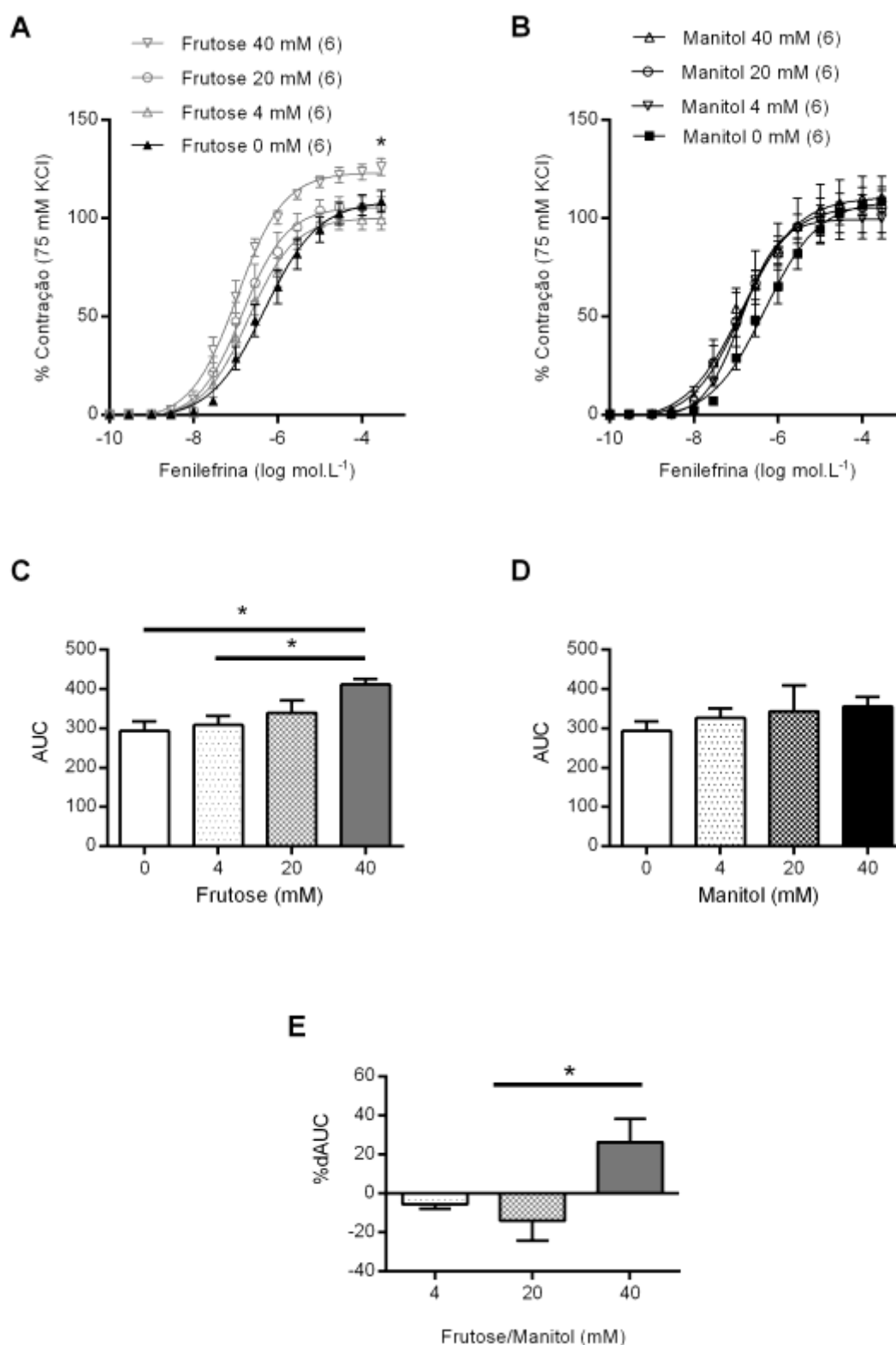


Figura 8. Curvas concentração-resposta à fenilefrina de anéis de aorta expostos a 0, 4, 20 e 40 mM de frutose (A) ou manitol (B). Áreas abaixo das curvas (AUC) dose-resposta à fenilefrina após exposição à frutose (C) e manitol (D). A magnitude do efeito da frutose excluindo seu efeito osmótico está representada pela diferença da área abaixo da curva (dAUC) de cada concentração usada de manitol e frutose (E). ANOVA uma via, *pos hoc* de Tukey, *P < 0,05 vs frutose 0 e 4 mM.

Baseado nesse resultado, e para uma melhor detecção das alterações induzidas pela sobrecarga de frutose, selecionamos a concentração de 40 mM de frutose para as demais análises vasculares deste estudo. Além disso, os estudos disponíveis na literatura sobre a exposição aguda à frutose usaram a concentração de 40 mM, o que facilitará a comparação e discussão dos resultados.

A adição de frutose ou manitol aumenta igualmente a osmolaridade das soluções. Assim, as diferenças observadas nas respostas vasculares de segmentos de aorta expostos à frutose comparados aos expostos ao manitol não podem ser atribuídas a alterações na osmolaridade da solução nutritora.

4.2. SOBRECARGA DE FRUTOSE ALTERA A CONTRAÇÃO E RELAXAMENTO DE ARTÉRIAS DE CONDUTÂNCIA

A exposição à frutose na concentração de 40 mM aumentou a resposta máxima à fenilefrina (Figura 9 A) e reduziu a sensibilidade à acetilcolina (Figura 9 B) em segmentos de aorta torácica de ratos. O relaxamento independente do endotélio induzido pelo nitroprussiato de sódio não foi alterado pela sobrecarga com frutose (Figura 9 C).

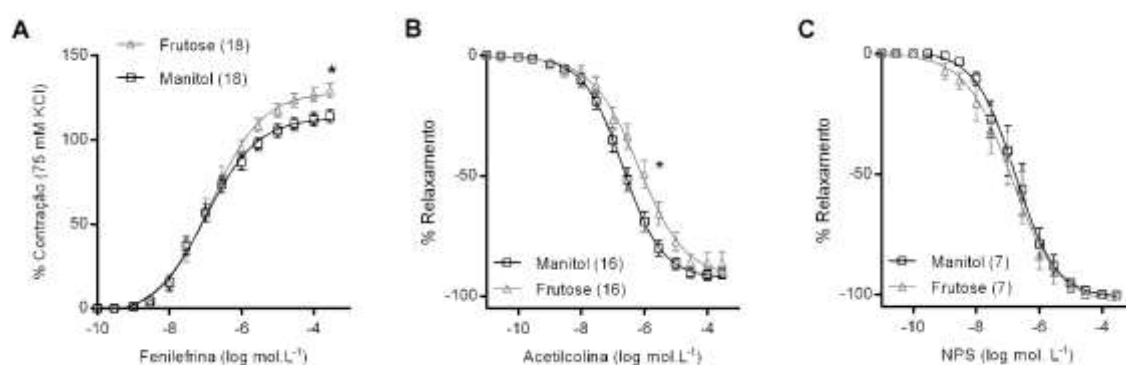


Figura 9. Curvas concentração-resposta à fenilefrina (A), acetilcolina (B) e nitroprussiato de sódio (NPS) (C) de segmentos de aorta expostos à frutose ou manitol. Teste t-Student, *P < 0,05 vs Manitol. Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses.

A tabela 2 apresenta os valores para a resposta máxima e sensibilidade das curvas concentração-resposta à fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio.

Tabela 2. Resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD₂) das curvas concentração resposta à fenilefrina, acetilcolina e nitroprussiato de sódio (NPS) após exposição à frutose ou manitol.

	Manitol		Frutose	
	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂
Fenilefrina	103 ± 3	7.05 ± 0.13	125 ± 4*	7.13 ± 0.24
Acetilcolina	-95 ± 3	5.61 ± 0.13	-91 ± 3	6.11 ± 0.16*
NPS	-100 ± 1	6.59 ± 0.22	-100 ± 1	6.65 ± 0.25

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD₂: -log EC₅₀. *P < 0,05 vs Manitol, Teste t-Student.

4.3. ANÁLISE DAS VIAS DE AGENTES VASOTIVOS NA RESPOSTA CONTRÁTIL DE ARTÉRIAS EXPOSTAS À FRUTOSE

Para investigar os mecanismos envolvidos no aumento da resposta contrátil induzido pela sobrecarga de frutose, foram feitas incubações de drogas inibidoras das principais vias de agentes que modulam a contração de artérias de condutância.

4.3.1. Participação do endotélio e da via do NO no aumento da resposta contrátil induzido pela frutose

Para investigar se a frutose prejudica a modulação endotelial da resposta contrátil à fenilefrina, segmentos de aorta tiveram o endotélio removido mecanicamente, foram expostos à frutose ou ao manitol, e incubados com doses crescentes de fenilefrina. A remoção do endotélio aumentou a resposta contrátil das artérias de ambos os grupos (Figura 10 A, B) mas em menor magnitude nos anéis expostos à frutose (Figura 10 C) (%dAUC, Manitol/E-: 82,8 ± 22,32; Frutose/E-: 16,6 ± 7,2; N = 6, P = 0,012). Este resultado sugere que a sobrecarga de frutose promove uma disfunção endotelial, que pode contribuir para o aumento da contratilidade.

O NO é um importante agente produzido no endotélio que, dentre outras funções, modula a contração do músculo liso subjacente (PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988). Sabendo que uma redução na biodisponibilidade deste agente pode contribuir para o aumento da contratilidade, a modulação da contratilidade pelo NO foi analisada em artérias expostas à frutose por meio da incubação de um inibidor da NOS, L-NAME. Semelhante à remoção do endotélio, a incubação com L-NAME aumentou a reatividade à fenilefrina em artérias expostas à frutose ou ao manitol (Figura 10 D, E). No entanto, o aumento da contratilidade após inibição da NOS foi menor na presença da frutose (Figura 10 F) (dAUC, Manitol/L-NAME: $74,7 \pm 19,7$; Frutose/L-NAME: $28,3 \pm 8,1$; $N = 8$, $P = 0,047$), sugerindo que a modulação da resposta contrátil pelo NO foi prejudicada pela sobrecarga de frutose.

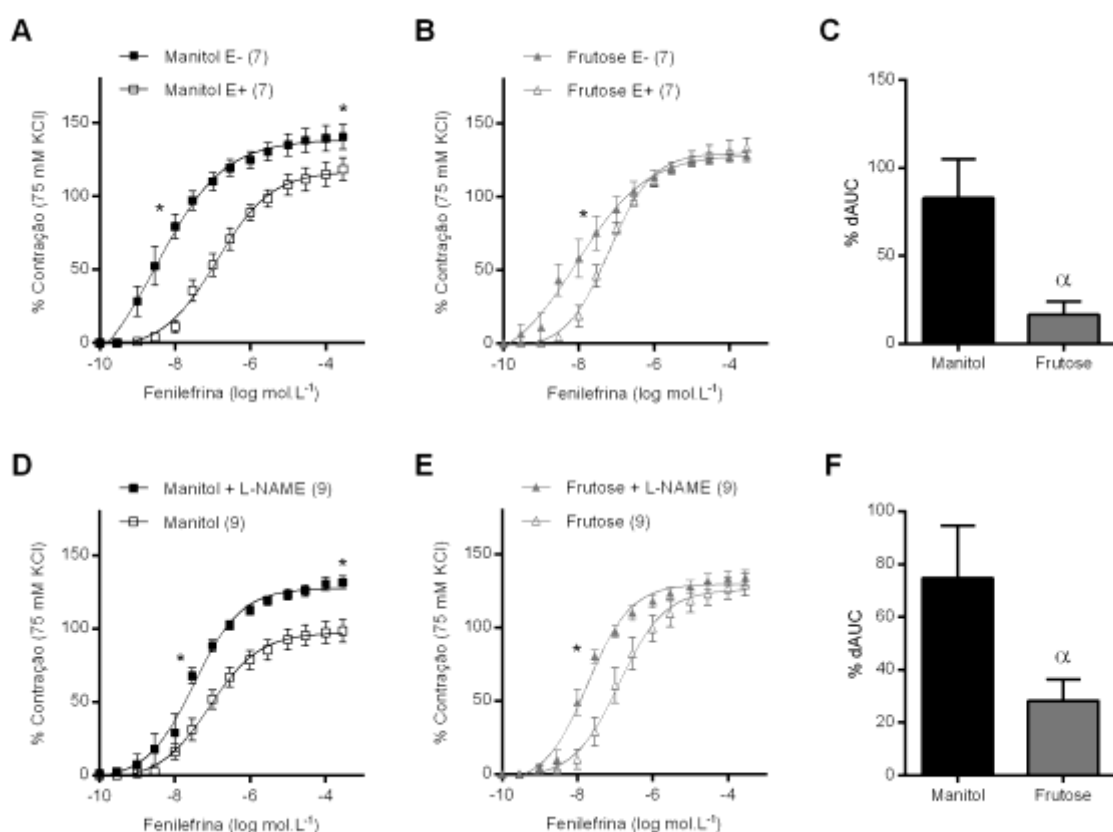


Figura 10. Curvas concentração-resposta à fenilefrina após remoção do endotélio (A, B) e inibição da NO sintase pelo L-NAME (D, E) na presença de manitol (A, D) ou frutose (B, E). A diferença da área abaixo da curva (dAUC) após remoção do endotélio (C) e incubação com L-NAME (F). Teste de t-Student, * $P < 0,05$ vs E+ ou sem droga, ° $P < 0,05$ vs Manitol. Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses. E-: segmentos de aorta após remoção mecânica do endotélio; E+: segmentos de aorta com endotélio intacto; %dAUC: porcentagem da diferença da área abaixo da curva.

4.3.2. Envolvimento de EROs na resposta contrátil de aorta exposta à frutose

Sabendo que a biodisponibilidade de NO pode ser reduzida pela ação de EROs e que estas podem contribuir para o aumento da resposta contrátil, a participação do ânion superóxido, do peróxido de hidrogênio e da NADPH oxidase na resposta contrátil de artérias incubadas com frutose foi analisada.

A incubação de SOD, um varredor enzimático de ânion superóxido, reduziu a reatividade à fenilefrina em ambos os grupos (Figura 11 A, B), mas a redução foi mais pronunciada na presença da frutose (Figura 11 C) (%dAUC Manitol/SOD: $-23,2 \pm 7,7$; Frutose/SOD: $-45,4 \pm 2,6$; N= 5, P = 0,044). Este resultado sugere que a frutose aumenta a ação contrátil do ânion superóxido.

Já a catalase reduziu apenas a resposta contrátil de anéis incubados com frutose (Figura 11 D, E, F), (%dAUC Manitol/Catalase: $-25,7 \pm 8,1$; Frutose/Catalase: $-29,5 \pm 10,5$; N= 5, P = 0,026) indicando que o peróxido de hidrogênio também está envolvido no aumento da contração induzido pela frutose.

A principal enzima produtora de EROs presente nas artérias é a NADPH oxidase. A inibição dessa enzima pela apocinina reduziu a reatividade vascular à fenilefrina de anéis de aorta expostos à frutose, sem alterar as respostas de anéis expostos ao manitol (Figura 11 G, H, I) (%dAUC Manitol/Apocinina: $24,2 \pm 11,6$; Frutose/Apocinina: $-17,7 \pm 9,4$; N= 5, P = 0,031). Diante desses dados, podemos afirmar que as EROs derivadas da NADPH oxidase contribuem para o aumento da resposta vasocontrátil na sobrecarga com frutose.

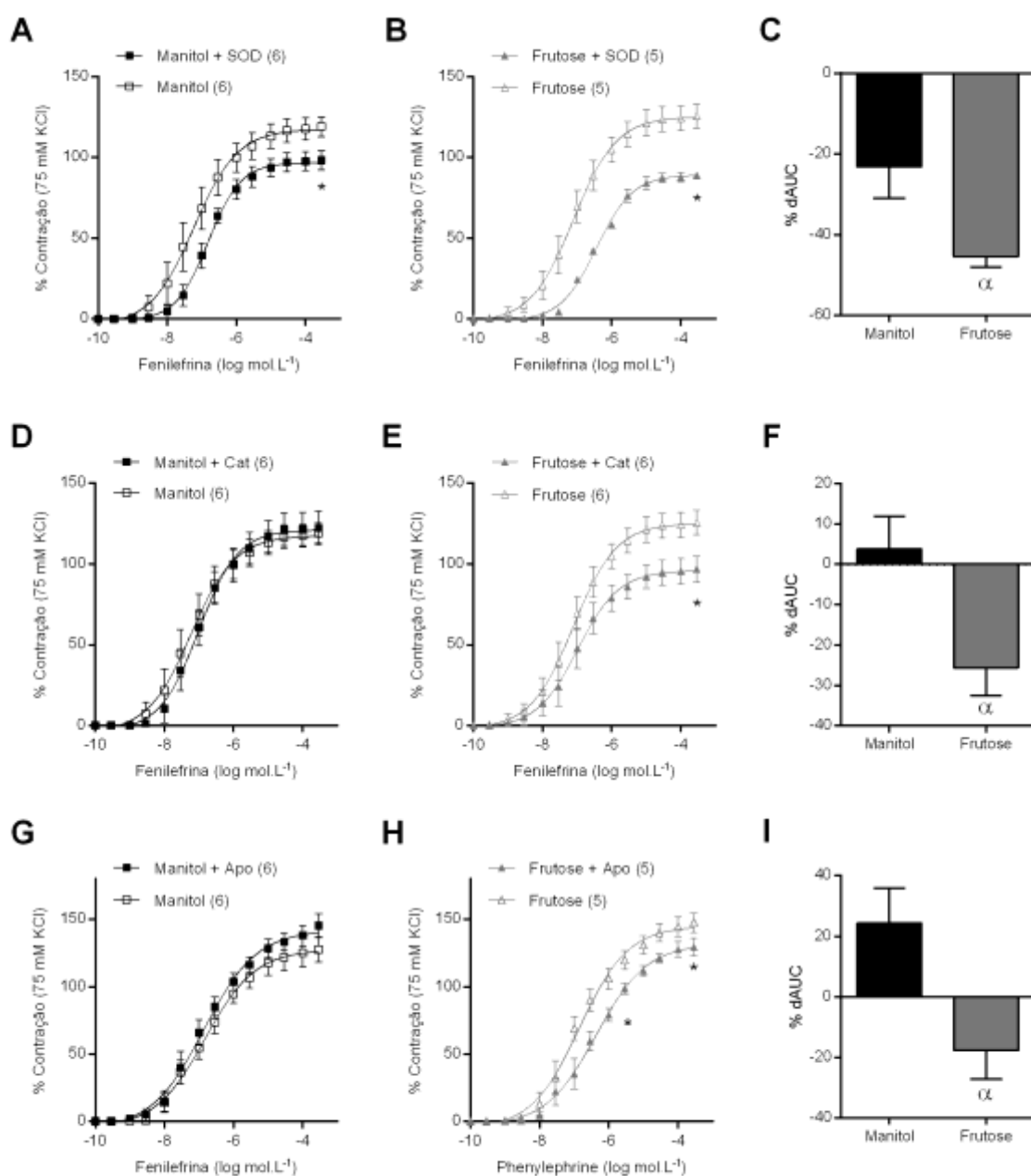


Figura 11. Curvas concentração-resposta à fenilefrina após incubação com SOD (A, B), catalase (Cat, D, E) e apocinina (Apo, G, H) em segmentos de aorta expostos ao manitol (A, D, G) e à frutose (B, E, H). Porcentagem da diferença das áreas abaixo das curvas (%dAUC) na presença de SOD (C), catalase (F) e apocinina (I). Teste de t-Student, * $P < 0,05$ vs sem droga, $^{\alpha}P < 0,05$ vs Manitol. Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses.

4.3.3. Participação da via da COX nas alterações vasculares induzidas pela sobrecarga aguda com frutose

Os prostanóides sintetizados por meio da ação da enzima COX podem alterar a função vascular, contribuir para o estresse oxidativo e modular a síntese de óxido

nítrico. Para investigar a participação da via da COX nas alterações vasculares promovidas pela sobrecarga com frutose foi utilizado um inibidor da COX, a indometacina. A incubação com indometacina não alterou a resposta contrátil de segmentos de aorta expostos à frutose ou ao manitol (Figura 12), indicando que modulação da contração pela via da COX não foi afetada pela sobrecarga aguda com frutose em artérias de condutância.

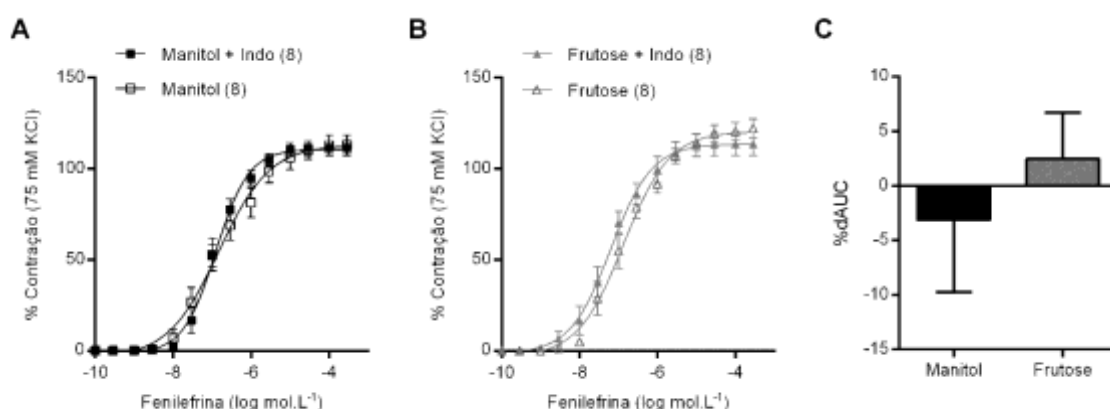


Figura 12. Curvas concentração-resposta à fenilefrina de aorta exposta ao manitol (A) ou á frutose (B) na presença ou não de indometacina (Indo). Áreas abaixo das curvas após bloqueio da COX pela indometacina (C). Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses. %dAUC: porcentagem da diferença da área abaixo da curva.

A tabela 3 apresenta os valores para a resposta máxima e sensibilidade das curvas concentração-resposta à fenilefrina

Tabela 3. Efeitos da remoção do endotélio (E-), L-NAME, SOD, catalase, apocinina e indometacina na resposta máxima (Rmax) e sensibilidade (pD₂) à fenilefrina de aorta incubada com frutose ou manitol.

	Manitol		Frutose	
	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂
Controle	103 ± 3	7,05 ± 0,13	127 ± 4*	7,13 ± 0,24
E-	140 ± 8*	8,76 ± 0,29*	129 ± 4	9,89 ± 2,10#
L-NAME	150 ± 10*	7,45 ± 0,16*	129 ± 5	7,72 ± 0,27#
SOD	98 ± 6*	6,85 ± 0,12	77 ± 9#	6,58 ± 0,15#
Apocinina	135 ± 9	7,05 ± 0,24	123 ± 4#	6,45 ± 0,23#
Catalase	111 ± 6	6,83 ± 0,13	97 ± 8#	7,02 ± 0,24
Indometacina	110 ± 2	6,90 ± 0,04	113 ± 3	7,19 ± 0,08

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD₂: - log EC₅₀ *P < 0,05 vs Manitol controle; #P < 0,05 vs Frutose controle, teste t-Student.

4.4. ANÁLISE DAS VIAS DE AGENTES VASOTIVOS NO RELAXAMENTO DEPENDENTE DO ENDOTÉLIO DE ARTÉRIAS EXPOSTAS À FRUTOSE.

4.4.1. Frutose altera a modulação do vasorelaxamento por ação das EROs

A participação das EROs na redução do relaxamento à acetilcolina induzido pela frutose foi investigada através da incubação de varredores enzimáticos para ânion superóxido (SOD) e peróxido de hidrogênio (catalase).

A incubação com SOD não alterou o relaxamento dependente do endotélio na presença do manitol (Figura 13 A), mas aumentou a resposta máxima à acetilcolina na presença da frutose (Figura 13 B, C) (%dAUC SOD Manitol: -7 ± 8,7; Frutose: 43 ± 16,7; N = 5; P = 0,022). Esse dado sugere que um aumento da ação anti-relaxante do ânion superóxido está envolvido na ação da frutose sobre o relaxamento.

Já a catalase reduziu o relaxamento mediado pela acetilcolina apenas na presença do manitol (Figura 13 C, E), não tendo afetado o relaxamento de segmentos de aorta expostos à frutose (Figura 13 D) (%dAUC Catalase Manitol: $-36 \pm 10,0$; Frutose: $-10 \pm 5,0$; N = 8; P = 0,031). Juntos, esses dados indicam a participação do peróxido de hidrogênio no relaxamento dependente do endotélio no grupo manitol, mas essa ação do peróxido de hidrogênio é abolida pela sobrecarga com frutose.

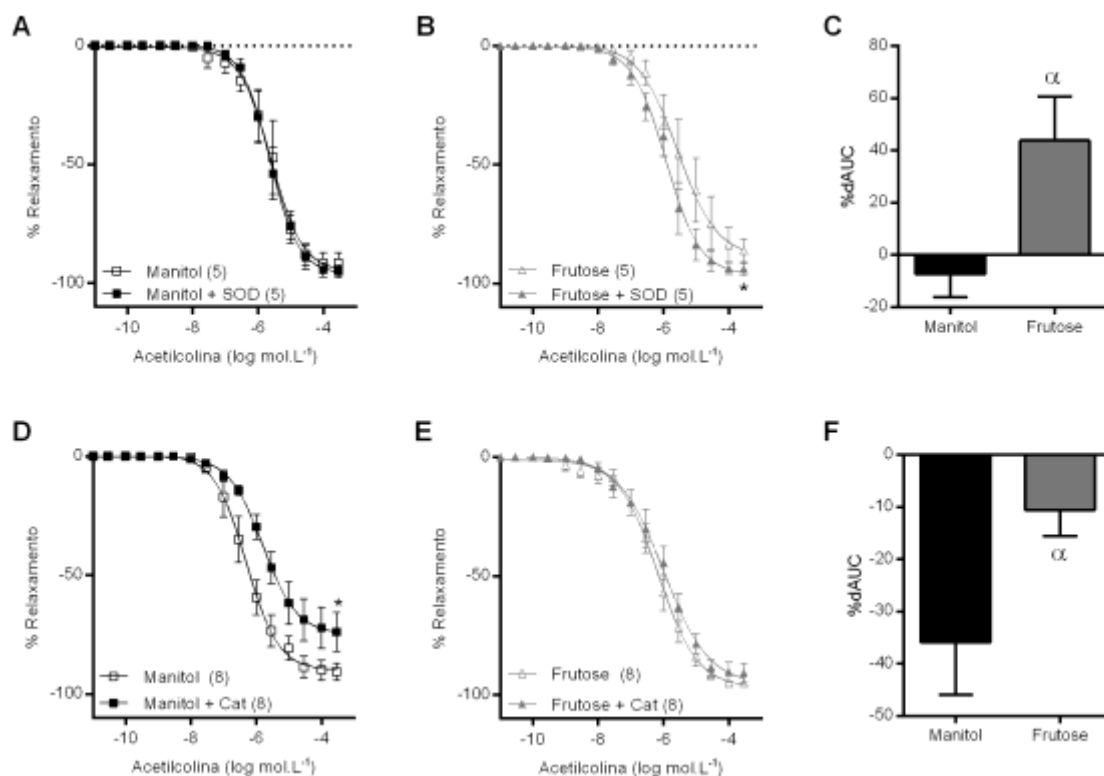


Figura 13. Participação do ânion superóxido (A, B) e do peróxido de hidrogênio (D, E) no relaxamento dependente do endotélio em aortas expostas ao manitol (A, D) e à frutose (B, E). Porcentagem da diferença da área abaixo da curva nas respostas à acetilcolina após incubação com apocinina (C) e alopurinol (F). Teste de t-Student, * p < 0,05 vs sem droga, α p < 0,05 vs Manitol. Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses. SOD: superóxido dismutase, varredor enzimático de ânion superóxido; Cat: catalase, varredor enzimático de peróxido de hidrogênio.

Os resultados descritos até então sugerem que a frutose reduz o relaxamento induzido pelo endotélio, provavelmente por uma ação de EROs. Sabendo que as principais enzimas envolvidas na produção de EROs são a NADPH oxidase e a xantina oxidase, a influência dessas enzimas sobre o relaxamento de artérias expostas à frutose foi investigada.

O bloqueio da ação da NADPH oxidase pela apocinina aumentou a sensibilidade à acetilcolina apenas na presença da frutose (Figura 14) (%dAUC

Apocinina Manitol: $-6 \pm 8,1$; Frutose: $37 \pm 10,7$; $N = 6$; $P = 0,012$) sugerindo que esta enzima está envolvida na redução do relaxamento dependente do endotélio na sobrecarga aguda de frutose.

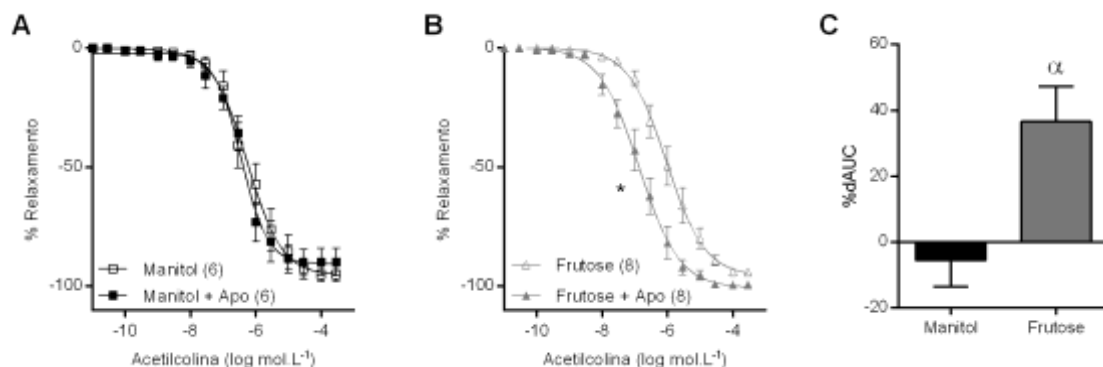


Figura 14. Efeito do bloqueio da NADPH oxidase sobre o relaxamento dependente do endotélio em aortas expostas ao manitol (A) e à frutose (B). Área abaixo da curva nas respostas à acetilcolina após incubação com apocinina (C). Teste de t-Student, * $P < 0,05$ vs sem droga, $\alpha P < 0,05$ vs Manitol. Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses. Apo: apocinina, inibidor da NADPH oxidase; AUC: área abaixo da curva.

4.4.2. Influência da via da COX no relaxamento mediado pelo endotélio na sobrecarga com frutose

Para investigar se os prostanóides produzidos pela COX contribuem para a redução do relaxamento dependente do endotélio em aortas expostas à frutose, foi utilizada a indometacina, inibidor não-seletivo da COX. A incubação com indometacina não alterou as respostas à acetilcolina na presença da frutose (Figura 15 B, C) ou do manitol (Figura 15 A, C), descartando a participação da via da COX nas alterações da vasodilatação elicitadas pela sobrecarga aguda com frutose.

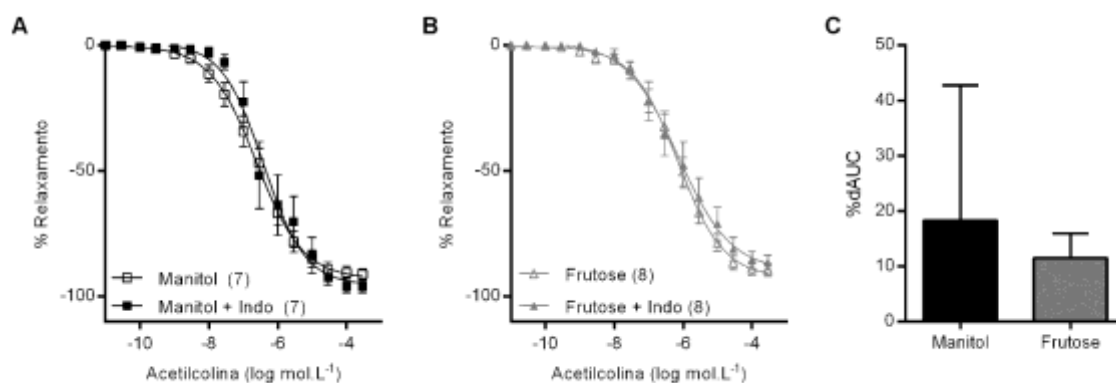


Figura 15. Efeitos da incubação com indometacina no relaxamento dependente do endotélio após exposição ao manitol (A) e à frutose (B). Porcentagem da diferença da área abaixo da curva (%dAUC) nas respostas à acetilcolina após incubação com indometacina. Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses. Indo: indometacina, inibidor da enzima ciclooxigenase.

4.4.3. Participação da via da angiotensina II no relaxamento de artérias expostas à frutose

Sabendo que a angiotensina II modula o relaxamento e pode afetar a produção de EROs pela NADPH oxidase, investigados a participação da via da angiotensina no relaxamento de artérias expostas à frutose utilizando um bloqueador de receptores AT1 (losartan). A incubação com losartan não afetou o relaxamento dependente do endotélio na presença de manitol (Figura 16 A, C) e de frutose (Figura 16 B, C), sugerindo que a sobrecarga aguda com frutose não altera a modulação do relaxamento pela angiotensina.

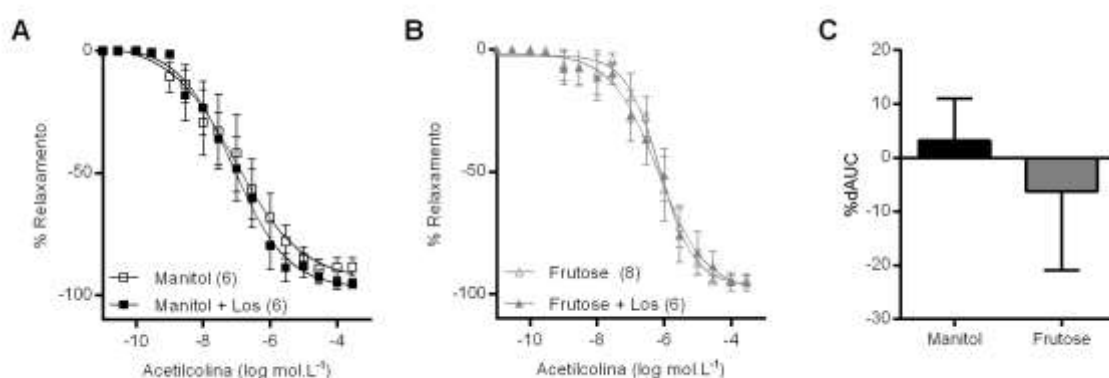


Figura 16. Efeitos da incubação com losartan no relaxamento dependente do endotélio após exposição ao manitol (A) e à frutose (B). Porcentagem da diferença da área abaixo da curva (%dAUC) nas respostas à acetilcolina após incubação com losartan. Número de animais usados em cada protocolo mostrado entre parênteses. Los: losartan, antagonista de receptor AT1.

A tabela 4 apresenta os valores para a resposta máxima e sensibilidade das curvas concentração-resposta à acetilcolina.

Tabela 4. Efeitos da SOD, catalase, apocinina, indometacina e losartan nas respostas vasculares à acetilcolina de aortas exposta ao manitol e à frutose.

	Manitol		Frutose	
	Rmax (%)	pD ₂	Rmax (%)	pD ₂
Controle	-92 ± 2	6,50 ± 0,24	-87 ± 4	6,11 ± 0,14*
SOD	-95 ± 6	6,06 ± 0,18	-96 ± 3#	5,90 ± 0,18
Catalase	-77 ± 8*	6,11 ± 0,23	-98 ± 3#	6,38 ± 0,53
Apocinina	-82 ± 8	6,40 ± 0,14	-92 ± 7	6,80 ± 0,19#
Indometacina	-101 ± 4	7,11 ± 0,46	-90 ± 3	5,99 ± 0,79
Losartan	-95 ± 3	7,03 ± 0,39	-95 ± 4	6,28 ± 0,43

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. Rmax: resposta máxima, expressa como porcentagem da resposta induzida por 75 mM de KCl. pD₂: - log EC₅₀. SOD: superóxido dismutase. *P < 0,05 vs Manitol controle; #P < 0,05 vs Frutose controle, teste t-Student.

4.5. EFEITOS DA SOBRECARGA DE FRUTOSE SOBRE A RESPIRAÇÃO DE CÉLULAS ENDOTELIAIS

Alterações na cadeia respiratória mitocondrial podem impedir a principal via de produção de energia, na forma de ATP, nas células, levando a diversas alterações, inclusive no sistema cardiovascular (BALLINGER E PATTERSON 2002). Durante o metabolismo da frutose, são produzidos compostos que servem como substratos para a cadeia respiratória mitocondrial, o que poderia alterar o funcionamento desta.

Para avaliar se a frutose altera o funcionamento da cadeia fosforilativa, contribuindo para disfunção endotelial, a função mitocôndria de células endoteliais isoladas foi avaliada na presença de diferentes concentrações de frutose (0, 1 e 10 mM). A taxa de consumo de oxigênio basal foi similar entre as células incubadas com frutose ou não (Figura 17, seguimentos I e II). Após o bloqueio da ATP sintase pela oligomicina, a taxa de consumo de oxigênio reduziu de forma semelhante entre os grupos (Figura 17, seguimento III). A taxa de respiração máxima, obtida por meio da ação do BAM15A, também não foi alterada pela sobrecarga aguda com frutose (Figura 17, seguimento IV). Juntos, esses resultados sugerem que a frutose não é utilizada para a produção de energia pela mitocôndria em células endoteliais.

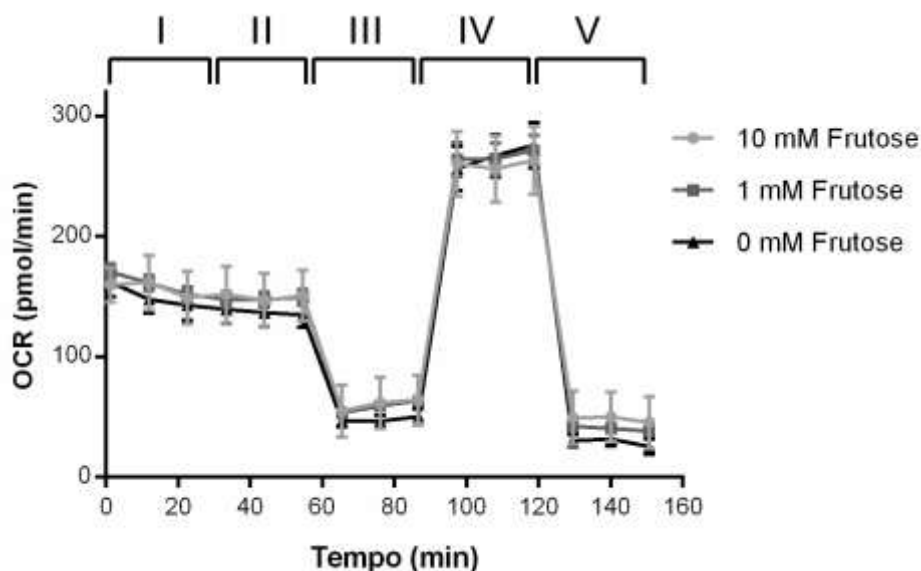


Figura 17. Análise do consumo de oxigênio de células endoteliais de artérias coronárias humanas após incubação com frutose (1 ou 10 mM) ou veículo (frutose 0 mM). (I) respiração basal; (II) respiração basal com frutose ou veículo; (III) vazamento de elétrons; (IV) capacidade respiratória máxima; (V) consumo de oxigênio extra-mitocondrial. OCR: taxa de consumo de oxigênio.

5. DISCUSSÃO

A frutose é um componente natural de frutas, mas tem sido usado na indústria alimentícia como adoçante de sucos e refrigerantes, o que aumentou consideravelmente o consumo deste monossacarídeo nos últimos 50 anos (WHITE, 2013). Alguns autores associam a ingestão de frutose com o desenvolvimento de sinais que caracterizam a síndrome metabólica (BRAY; NIELSEN; POPKIN, 2004; YANAI et al., 2008), além de desordens cardiovasculares como aumento da pressão arterial (JALAL et al., 2010; KLEIN; KIAT, 2015; YANAI et al., 2008). Esses efeitos cardiometabólicos induzidos pela frutose dependem da duração da dieta e da quantidade de frutose ingerida, sendo frequentemente associados a ação de seus metabólitos. No entanto, um estudo mostrou em indivíduos saudáveis o aparecimento de efeitos cardiovasculares minutos após a ingestão de alta concentração de frutose, incluindo aumento da pressão arterial associada à redução da condutância das artérias braquial e poplítea. No entanto, não é possível determinar se esses efeitos resultaram de uma ação direta da frutose ou da hiperglicemia decorrente da rápida conversão da frutose (ENDO et al., 2014). Para investigar o efeito direto da frutose em artérias de condutância, nós incubamos segmentos aórticos com 40 mM de frutose durante 30 minutos e analisamos as respostas vasculares a agentes vasoativos. Nossos resultados demonstram que a frutose altera a função endotelial de vasos de condutância devido ao estresse oxidativo.

5.1. EFEITOS DA FRUTOSE SOBRE A CONTRATILIDADE DE ARTÉRIAS É DOSE-DEPENDENTE

A fenilefrina é um agonista α 1-adrenérgico que atua sobre receptores no músculo liso vascular levando à contração e, conseqüentemente, redução da luz dos vasos sanguíneos. Os receptores alfa-1-adrenérgicos estão ancorados à membrana plasmática das células musculares lisas e, uma vez ativados por ação de agonistas, ativa a proteína Gq que cliva o fosfatidilinositol bifosfato (PIP₂) em inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O IP₃ age em receptores presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, estimulando a liberação de Ca²⁺ para o sarcoplasma.

Enquanto isso, o DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que, por sua vez, fosforila canais para cálcio no sarcolema, contribuindo para o aumento da concentração intracelular de cálcio. O aumento do cálcio sarcoplasmático favorece a formação do complexo Ca^{2+} -calmodulina que ativa a quinase da cadeia leve da miosina e esta catalisa a fosforilação da cadeia leve da miosina. A fosforilação dessa ativa a ATPase miosínica que permite a formação das pontes cruzadas entre actina e miosina promovendo assim, a contração do músculo liso (KOEPPEN, 2011).

Nós realizamos curvas concentração-resposta à fenilefrina em anéis de aorta na presença de diferentes concentrações de manitol ou frutose. O manitol, assim como a frutose, é uma hexose, mas é pouco absorvida pelas células, sendo frequentemente usado para aumentar a osmolaridade de uma solução. De fato, a adição tanto do manitol, quanto da frutose aumentou igualmente a osmolaridade da solução a que foram expostos os segmentos de artéria. No entanto, não foi observada alteração significativa da resposta contrátil à fenilefrina após adição de manitol, em nenhuma das concentrações estudadas. Já nos anéis de aorta incubados com frutose, foi observado aumento da resposta máxima com o aumento da concentração de frutose, sendo observado aumento estatisticamente significativo da contratilidade na concentração de 40 mM quando comparado às concentrações de 0 e 4 mM de frutose. Esse resultado indica que a frutose aumenta a resposta contrátil de artérias de condutância de maneira dose-dependente. A partir desse resultado, escolhemos a concentração de 40 mM de frutose para estudar os mecanismos envolvidos nas alterações vasculares induzidas pela frutose. Essa concentração também foi utilizada em outros estudos que analisaram os efeitos da frutose sobre a função vascular (MORENO; HONG, 2013; PEREDO et al., 2006; RICHEY et al., 1997). A concentração sérica de frutose após jejum de 12 horas varia entre 0,01 a 0,07 mM (PRESTON; CALLE, 2010; PRIETO et al., 2004; WAHJUDI et al., 2010). Após a ingestão de alimentos ricos em frutose, a concentração de frutose no plasma pode aumentar até 5 vezes (PRESTON; CALLE, 2010). No entanto, já foi observado em indivíduos saudáveis em jejum, níveis séricos de 2 mM de frutose, chegando a níveis 8 vezes maiores 15 minutos após a ingestão de frutose (HUI et al., 2009). No nosso estudo, segmentos de aorta foram expostos a uma alta concentração de frutose (40 mM). Embora esta concentração seja maior do que a encontrada no sangue de humanos, o objetivo do estudo é analisar os efeitos da sobrecarga aguda de frutose sobre a reatividade

vascular de aorta de ratos, e não de níveis normais desse açúcar encontrados no sangue.

5.2. SOBRECARGA COM FRUTOSE INDUZ DISFUNÇÃO ENDOTELIAL EM ARTÉRIAS DE CONDUTÂNCIA

O relaxamento do músculo liso pela acetilcolina ocorre de forma indireta, via fatores produzidos no endotélio vascular. A acetilcolina se liga a receptores muscarínicos do tipo M3 na membrana das células endoteliais e, por meio da ação de IP3 e DAG, aumentam a concentração intracelular de cálcio, o que ativa vias de produção de mediadores como o NO, a prostaciclina e EDHF. Estes mediadores se difundem para o músculo liso vascular e incitam a hiperpolarização dessas células (Figura 18). Em nossos experimentos, além do aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina, observamos também uma redução da resposta vasodilatadora à acetilcolina após a incubação com frutose. Resultados semelhantes foram relatados por Moreno e Hong (2013), que observaram uma redução do relaxamento induzido pela acetilcolina em anéis de aorta após 4 horas de incubação com frutose (MORENO; HONG, 2013).

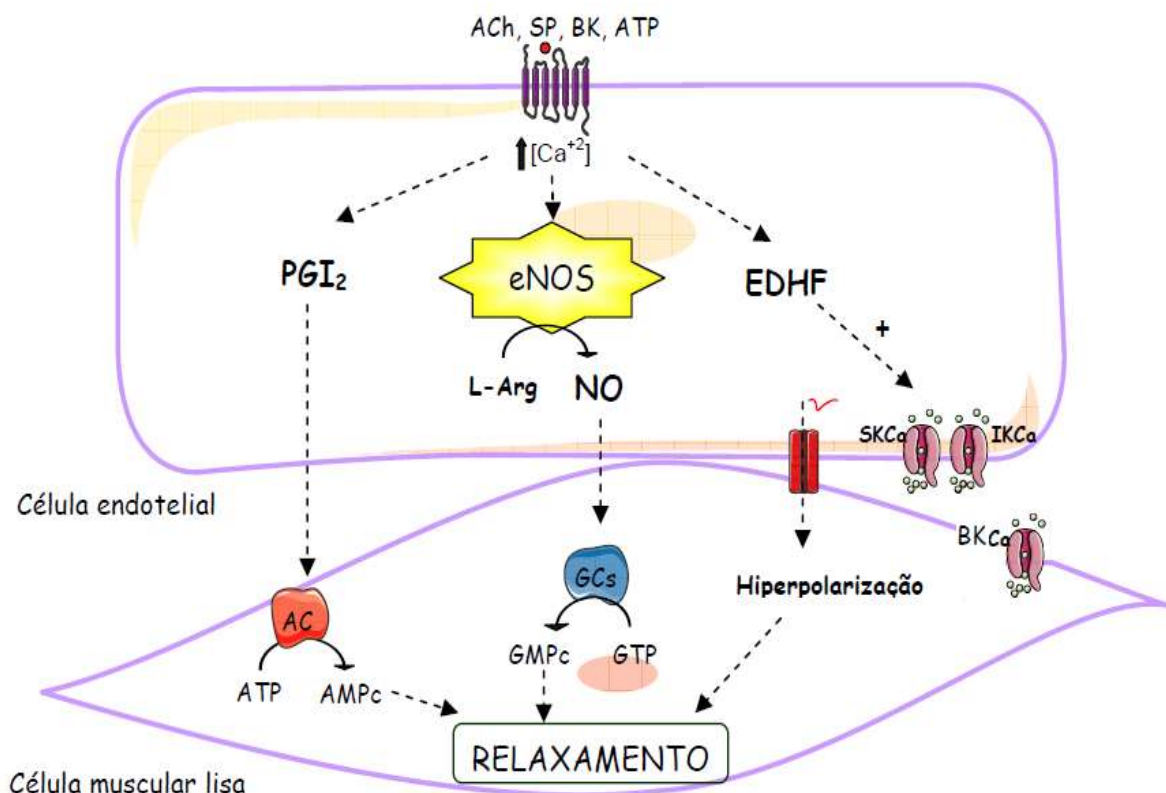


Figura 18. Fatores vasodilatadores produzidos pelo endotélio vascular. São três as principais vias endoteliais que geram a vasodilatação: a via da prostaciclina (PGI_2), a via de produção do óxido nítrico (NO) pela enzima eNOS, e a via do fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF). Dependendo do tipo de vaso, todas estas vias podem ser ativadas após a estimulação de receptores das células endoteliais em cuja via de sinalização ocorra o aumento da concentração intracelular do Ca^{2+} . Dentre os agonistas pode-se citar a acetilcolina (ACh), substância P (SP), bradicinina (BK), e adenosina trifosfato (ATP). Após a liberação pelas células endoteliais, estes mediadores exercem suas ações nas células musculares lisas, através da produção dos segundo mensageiros AMPc ou GMPc, ou ainda através da hiperpolarização. (Modificado de Rattmann, 2009).

O óxido nítrico é o principal mediador do relaxamento induzido pela acetilcolina em artérias de condutância. Sua produção é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase a partir da L-arginina e oxigênio molecular. O NO produzido pelo endotélio é difundido para o músculo liso vascular, onde provoca relaxamento por meio de vários mecanismos que inclui a ativação da guanilato ciclase, levando à produção de GMPc, que estimula a receptação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e a extrusão de cálcio para o meio extracelular, e reduz a afinidade das proteínas contráteis pelos íons cálcio. Além disso, o NO pode estimular diretamente, ou via GMPc, a abertura de canais para potássio, causando hiperpolarização do músculo liso vascular. Para avaliar a resposta do músculo liso ao NO, realizamos curvas concentração-resposta ao nitroprussiato de sódio, um doador de NO, em segmentos de aorta expostos à frutose. A incubação com frutose não alterou o relaxamento induzido pelo NO. Além

disso, a remoção do endotélio induziu um menor aumento da reatividade à fenilefrina na presença da frutose, sugerindo que a frutose altera a função endotelial de modulação da contração do músculo liso vascular. Juntos, esses resultados indicam que a incubação com 40 mM de frutose induz uma disfunção endotelial, com prejuízo do relaxamento e favorecimento da ação contrátil.

A disfunção endotelial induzida pela sobrecarga de frutose já foi relatada em estudos experimentais após um consumo crônico de frutose. El-Bassossy e colaboradores observaram redução do relaxamento dependente do endotélio em aorta de ratos tratados com solução aquosa de frutose (10%) durante 9 semanas. Alterações mais precoces foram observadas como o aumento insulinemia e pressão arterial, indicando que esses podem ser os mediadores das alterações vasculares induzidas pela suplementação dietética com frutose (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014). Resultados similares foram obtidos após 40 semanas de dieta enriquecida com 60% de frutose, onde foi observado aumento da pressão arterial e da insulina plasmática, acompanhado de redução do relaxamento à acetilcolina em artérias mesentéricas (TAKAGAWA et al., 2001). Nossos resultados sugerem que as alterações da função endotelial induzidas pelo consumo excessivo de frutose acontecem imediatamente ao consumo, e que provavelmente, modulam as mudanças crônicas da função vascular em face de um consumo prolongado.

5.3. FATORES ENDOTELIAIS ENVOLVIDOS NO EFEITO DA FRUTOSE SOBRE AS RESPOSTAS VASOMOTORAS

O endotélio vascular é formado por uma camada de células epiteliais que reveste internamente os vasos sanguíneos e exerce um importante papel na modulação da função vascular. O endotélio sintetiza diversos fatores que regulam a angiogênese, as respostas inflamatórias e o tônus vascular. O controle vasomotor promovido pelo endotélio ocorre por meio da síntese e secreção de agentes que podem facilitar as respostas contráteis e relaxantes do músculo liso vascular subjacente (KOEPPEN, 2011). Sabendo que um desequilíbrio da ação desses fatores pode alterar as respostas vasomotoras, nós investigamos a participação desses fatores no relaxamento e na contração de artérias incubadas com frutose na tentativa

de elucidar o mecanismo através do qual a frutose leva a alterações na função vascular.

5.3.1. Efeitos da sobrecarga de frutose sobre a via do óxido nítrico

O principal fator relaxante derivado do endotélio em artérias de condutância é o NO. A biodisponibilidade de NO tem sido frequentemente associada à disfunção endotelial, inclusive em modelos experimentais de hipertensão, diabetes e aterosclerose (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). Nossos resultados mostraram que a frutose prejudica a modulação do NO sobre a contração à fenilefrina. Além disso, os resultados das curvas concentração-resposta ao NPS, um doador de NO, mostram que a resposta vasodilatadora mediada pelo NO não foi afetada pela frutose. Juntos, esses resultados indicam que a frutose altera a biodisponibilidade de NO, mas não altera a resposta do músculo liso elicitada por esse vasodilatador.

A dieta crônica com frutose também foi associada a alterações na via do óxido nítrico. Após 8 semanas de suplementação com solução aquosa de frutose (10%) foi observada redução da atividade da eNOS em células endoteliais de aorta de ratos, acompanhado de aumento de pressão arterial e redução da tolerância à glicose (MIATELLO et al., 2001).

A redução da biodisponibilidade de NO é resultado de produção ineficiente ou de aumentada degradação, principalmente pela ação de agentes oxidantes como o ânion superóxido (COHEN; ADACHI, 2006).

5.3.2. Participação das espécies reativas de oxigênio na reatividade vascular de aorta exposta à frutose

As espécies reativas de oxigênio são compostos químicos altamente instáveis e reativos. As EROS são sintetizadas na célula principalmente como coproduto do metabolismo celular, agindo como mensageiros secundários em diversos processos fisiológicos como proliferação, diferenciação e envelhecimento celular, além de estarem envolvidas em processos de defesa do hospedeiro e de reparo tecidual (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016). No entanto, esses processos, que são vitais para a função normal da célula, podem se tornar exagerados e contribuir para indução,

manutenção ou mesmo agravamento de diversas doenças, especialmente as cardiovasculares. Em grandes quantidades, as EROs podem reagir com os ácidos nucleicos e outras moléculas essenciais para a manutenção da integridade estrutural e funcional das células (LOPERENA; HARRISON, 2017). Já se sabe, inclusive, que as EROs contribuem para a disfunção endotelial na aterosclerose (WATTANAPITAYAKUL; BAUER, 2001). Por isso, é importante um equilíbrio entre a produção e degradação desses compostos químicos por enzimas pró e antioxidantes, respectivamente, e um desequilíbrio nestas vias leva ao estresse oxidativo (GRIENDLING; SORESCU; USHIO-FUKAI, 2000). As principais EROs sintetizadas nas células são: o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^{\cdot}), o peroxinitrito ($OONO^-$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O $O_2^{\cdot-}$ é formado pela redução univalente do oxigênio molecular e pode ser reduzido a H_2O_2 e O_2 pela SOD, mas sua reação com o NO ocorre mais rapidamente levando à produção de $OONO^-$. Além disso, o $OONO^-$ pode oxidar a tetrahydrobiopterina, uma coenzima da NOS, levando ao desacoplamento dessa enzima, que passa a produzir ânion superóxido em maior quantidade do que NO (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016).

A superóxido dismutase é uma enzima que converte o ânion superóxido à peróxido de hidrogênio e água, funcionando como um varredor enzimático de ânion superóxido. Para avaliar se o ânion superóxido está envolvido na disfunção endotelial induzido pela exposição aguda à frutose, segmentos de aorta foram incubados com SOD na presença ou não da frutose. A incubação com SOD reduziu a contração e aumentou o relaxamento em artérias expostas à frutose, sugerindo que a frutose aumenta a quantidade de ânion superóxido, levando ao estresse oxidativo. Esse dado corrobora um estudo anterior em que o ácido lipóico, um antioxidante, melhorou a função endotelial de segmentos de aorta de ratos após 4 horas de incubação com frutose (MORENO; HONG, 2013). Além disso, após 8 semanas de dieta contendo 66% de frutose, ratos Zucker apresentaram redução do relaxamento e aumento de ânion superóxido em artérias femurais, acompanhado de aumento dos níveis sanguíneos de insulina, triglicerídeos e colesterol (ROMANKO et al., 2009).

O H_2O_2 é outra importante ERO gerada no endotélio vascular. Sua síntese pode ocorrer a partir do ânion superóxido, por dismutação catalisada pela SOD (SATO et al., 2014). Em contraste com o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio é relativamente estável e exerce funções fisiológicas importantes como a ativação da transcrição gênica e modulação da atividade de fosfatases (LOPERENA; HARRISON,

2017). Além disso, tem sido relatado que o peróxido de hidrogênio aumenta a expressão e atividade da NOS, contribuindo para vasodilatação. Apesar do peróxido de hidrogênio ter um papel importante na homeostase vascular, em altas concentrações, ele pode causar disfunção endotelial e aumento da resposta contrátil (SATO et al., 2014). Alguns estudos têm sugerido que o peróxido induz o desacoplamento da NOS e (CAI, 2005) e ativação da NADPH oxidase (LI et al., 2001), aumentando o ânion superóxido e este contribui para o aumento da resposta contrátil. As curvas de relaxamento e contração obtidas após incubação com catalase, um varredor enzimático de peróxido de hidrogênio, evidencia que a frutose aumenta a produção de peróxido de hidrogênio, levando à vasoconstrição e redução do relaxamento dependente do endotélio.

A NADPH oxidase tem como função primária a produção de ânion superóxido, sendo uma das mais importantes fontes de ânion superóxido nas células. Diversas isoformas da NADPH oxidase já foram descritas, tendo uma estrutura comum formada por sete domínios transmembrana e um domínio citosólico, onde se ligam o NADPH e FAD. Essas enzimas têm capacidade de transportar elétrons através da membrana plasmática e gerar ânions superóxido. Cada membro da família da NADPH oxidase (NOX) exerce um efeito biológico específico e tendo diferente distribuição entre os tecidos (MONTEZANO; TOUYZ, 2012). As EROs provenientes da excessiva ativação da NADPH oxidase têm sido implicadas em uma variedade de doenças vasculares, incluindo hipertensão (DELBOSC et al., 2005). A análise dos nossos dados indica importante papel do ânion superóxido nas alterações vasomotoras induzidas pela exposição aguda à frutose. Para investigar se a NADPH oxidase é responsável pelo excesso de ânions superóxido observado em artérias expostas à frutose, utilizamos a apocinina, um inibidor da NADPH oxidase. A incubação da apocinina mostrou uma importante participação dessa enzima nas respostas vasomotoras à acetilcolina e fenilefrina após exposição à frutose, indicando que a NADPH oxidase pode ser a fonte de ânion superóxido em excesso observado na presença da frutose. Esses resultados reforçam a hipótese de que a exposição aguda à frutose leva ao estresse oxidativo, reduzindo a biodisponibilidade de NO e a resposta vasodilatadora dependente do endotélio, além de contribuir para o aumento da vasoconstrição em resposta à agonistas alfa-adrenérgicos.

Nossos dados são fortalecidos por outro estudo que observou aumento da expressão da isoforma NOX4 em aorta de ratos sob dieta com frutose. Os autores

também observaram que a incubação com captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, preveniu essa super-expressão de NOX4 (NYBY et al., 2007). É importante ressaltar que nossos resultados foram obtidos após 30 minutos de exposição à frutose, o que, talvez, não seria tempo suficiente para alterar significativamente a expressão da enzima.

5.3.3. A modulação da vasomotricidade pela angiotensina II não foi alterada após sobrecarga com frutose

Já se sabe que a angiotensina, via receptor para angiotensina II do tipo I (AT1), ativa a produção de ânion superóxido pela NADPH oxidase (RINCÓN et al., 2015). Além disso, a ativação de receptores AT1 na membrana de células musculares lisas promove contração via ativação de fosfolipase C que catalisa a síntese de IP3 e DAG, resultando na elevação da concentração intracelular de cálcio (KOEPPEN, 2011). A síntese de angiotensina II ocorre por uma cascata de reações que se inicia com a ação catalítica da renina sobre o angiotensinogênio, tendo como produto, a angiotensina I. A enzima conversora de angiotensina (ECA) converte a angiotensina I à angiotensina II (COSTEROUSSE et al., 1992). Embora classicamente esse eixo seja descrito com cada etapa ocorrendo em um órgão diferente, como os rins, fígado e pulmão; já foi demonstrado que o endotélio apresenta todo o aparato necessário para a produção de angiotensina II independente de outros tecidos (ADMIRAAL et al., 1990). Nyby e colaboradores (2007) observaram que a incubação de segmentos de aorta com captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina, preveniu a superexpressão de NOX induzida pela dieta rica em frutose (NYBY et al., 2007). No entanto, em nosso estudo, a incubação com losartan, um antagonista de receptor para angiotensina (AT1), não afetou as respostas contráteis e relaxantes de artérias após sobrecarga com frutose. Esse resultado descarta a hipótese de que a angiotensina II, via AT1, estaria envolvida na geração aguda de estresse oxidativo mediado pela NADPH oxidase em aorta exposta à frutose.

5.3.4. A sobrecarga de frutose não afeta a modulação das respostas vasomotoras pela via da ciclooxigenase

Outros importantes reguladores do tônus vascular são os prostanóides derivados da via da ciclooxygenase (COX). A síntese dos prostanóides derivados do ácido araquidônico se inicia pela ação da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) sobre os fosfolipídios de membrana, resultando na liberação do ácido araquidônico para o citoplasma da célula. O ácido araquidônico é convertido pela ciclooxygenase à prostaglandina G₂ (PGG₂), e esta, à prostaglandina H₂ (PGH₂) pela peroxidase. A ciclooxygenase se apresenta em duas isoformas principais: COX-1 e COX-2. A regulação da atividade e expressão de cada isoforma é diferente e elas podem ter ações independentes no mesmo tipo de célula. Ambas as isoformas dependem de peróxidos lipídicos para sua ativação, mas a COX-2 é ativada por uma concentração de peróxido 10 vezes menor do que requer a COX-1 (MORITA, 2002). A COX-1, embora seja expressa constitutivamente, pode ter sua expressão aumentada por diversos fatores, à exemplo do estresse de cisalhamento (DOROUDI et al., 2000). A COX-2 também é expressa constitutivamente em alguns tecidos, incluindo o endotélio vascular, além de ter sua expressão induzida em sítios inflamatórios (FUNK; FITZGERALD, 2007). Em condições normais, os vasos sanguíneos expressam ambas as isoformas da COX, com predominância da COX-1 (TANG; VANHOUTTE, 2007). A partir da PGH₂ são produzidas 5 prostaglandinas pela ação de enzimas específicas, são elas: prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) prostaciclina (PGI₂) e tromboxano (TXA₂) (MARDINI; FITZGERALD, 2001) (Figura 19). Esses prostanóides agem em receptores específicos, exercendo ações diversas no organismo que abrangem desde a promoção da secreção gástrica e da sensação dolorosa até a reabsorção de água nos túbulos renais (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011). Os prostanóides também têm um papel importante na manutenção da função vascular, em especial o TXA₂ e a PGI₂. O TXA₂ é derivado, predominantemente, da COX-1 e exerce importante papel na agregação plaquetária, além de agir como vasoconstritor. Já a prostaciclina, derivada da COX-2, age contrapondo os efeitos do TXA₂, tendo ação antiagregante e relaxante, sendo um importante agente vasodilatador dependente produzido no endotélio (MONCADA et al., 1977). As ações vasomotoras dos derivados da COX também incluem a geração endotelial de espécies reativas de oxigênio. Assim, as prostaglandinas vasoconstritoras derivadas da COX-1 contribuem para a disfunção endotelial e as prostaglandinas vasodilatadoras derivadas da COX-2 exercem um importante efeito

compensatório, principalmente na hipertensão (FÉLÉTOU; HUANG; VANHOUTTE, 2011).

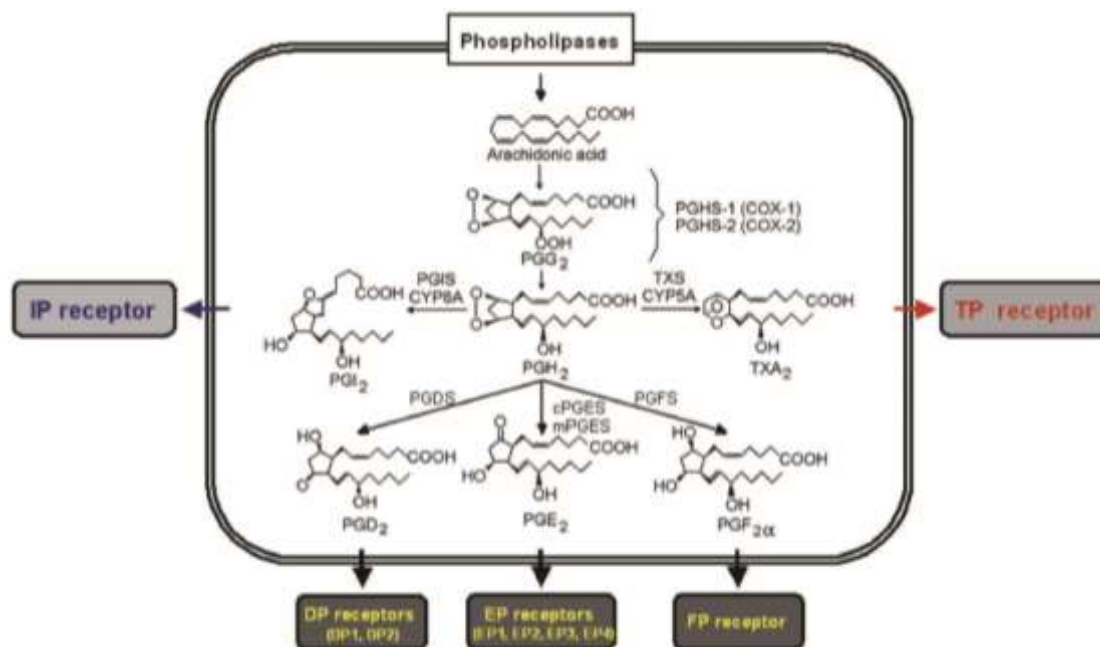


Figura 19. Metabolismo de ácido araquidônico e formação de prostanóides pela ação das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2). Os prostanóides agem em receptores preferenciais e seus subtipos estão identificados: IP, DPs, EPs, FP e TP para prostaciclina (PGI₂), prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) e tromboxano (TXA₂), respectivamente. PGIs: prostaciclina sintase; TXS: tromboxano sintase; PGHS: prostaglandina H sintase; PGDS: prostaglandina D sintase; PGFS: prostaglandina F sintase; cPGES: prostaglandina E sintase citosólica; mPGES: prostaglandina E sintase da membrana. (Extraído de Féléto et al, 2011).

Richey e colaboradores (1997) descreveram que a perfusão do leito mesentérico com frutose levou a uma redução do relaxamento endotélio-dependente, e esse efeito foi abolido pelo bloqueio da ciclooxigenase, sugerindo que a exposição aguda à frutose pode causar disfunção endotelial por aumento da produção de prostanóides (RICHEY et al., 1997). A participação da via da COX nos efeitos da frutose sobre o relaxamento também foi relatada por Peredo e colaboradores (2006), que relataram um aumento dos níveis de tromboxano e redução de prostaciclina no leito vascular mesentérico, após 60 minutos de incubação com frutose (PEREDO et al., 2006). Nossos resultados não mostram participação da via da COX nas alterações das respostas vasculares induzidas pela frutose em segmentos de aorta. De fato, o estudo da liberação de prostanóides em resposta à exposição à frutose foi observada apenas no leito mesentérico, mas não em aortas (PUYÓ et al., 2009). Podemos sugerir então que o efeito da frutose sobre modulação das vasomotricidade pelos

prostanóides é sítio-específico, se tornando evidente em apenas alguns leitos vasculares, à exemplo do mesentérico.

5.4. METABOLISMO DA FRUTOSE EM CÉLULAS ENDOTELIAIS

Outra importante fonte de espécies reativas de oxigênio nas células endoteliais é a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, sendo que 1-3% do oxigênio molecular é convertido à ânion superóxido nos complexos mitocondriais I e III durante a fosforilação oxidativa (MURPHY, 2009). Grande parte dessas EROs geradas pela mitocôndria são neutralizadas pela ação de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase (WATTANAPITAYAKUL; BAUER, 2001) mas um desequilíbrio nesse sistema pode causar estresse oxidativo.

A mitocôndria exerce um importante papel nas vias de sinalização celular, por meio da modulação de estoques de cálcio, geração de EROs e respiração. A cadeia respiratória mitocondrial é a principal via de produção de energia das células e alterações na função mitocondrial têm sido associadas a diversas doenças como obesidade, diabetes e insuficiência cardíaca (BALLINGER et al., 2002).

A hiperglicemia crônica, que pode ser resultado de um alto consumo de frutose, leva a complicações vasculares (BERTOLUCI et al., 2015), que podem estar associadas ao seu efeito sobre a mitocôndria. Há relatos de que a hiperglicemia induz um excesso de transporte de elétrons pela cadeia oxidativa, na membrana interna da mitocôndria. Esses elétrons são capturados pelo O_2 , formando ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (KASSAB; PIWOWAR, 2012). Nossos dados indicam que a exposição in vitro à frutose leva à uma disfunção endotelial causada por estresse oxidativo, que poderia ser gerado por uma hiperestimulação da cadeia respiratória mitocondrial. No entanto, os dados de análise da função mitocondrial de células endoteliais mostram que a frutose, mesmo após 30 minutos de incubação, não altera a função mitocondrial.

Por muito tempo se pensou que o metabolismo da frutose ocorresse exclusivamente no fígado, por ação da frutoquinase. Recentemente foi relatado que outra isoforma dessa enzima, a frutoquinase A, é expressa em outros tipos celulares, inclusive nas células endoteliais. Entretanto, a frutoquinase A apresenta atividade enzimática muito menor do que a isoforma hepática (ISHIMOTO et al., 2012). Por ação

dessas enzimas, a frutose é convertida à frutose-1-P, que é então clivada a trioses. A partir desses compostos, o metabolismo da frutose pode ser direcionado para a síntese de glicose, glicogênio, triglicerídeos ou para o ciclo de Krebs.

Independente do rumo que tome o metabolismo hepático da frutose, ocorre produção de substrato para a fosforilação oxidativa mitocondrial, com aumento do transporte de elétrons através dos complexos presentes na membrana interna da mitocôndria. Assim, a incubação de doses crescentes de frutose poderia estimular o aumento do consumo de oxigênio pelas células. Surpreendentemente a taxa de consumo basal de oxigênio não foi diferente entre células endoteliais incubadas com 0, 1 ou 10 mM de frutose. A taxa de produção de ATP e capacidade máxima respiratória também não foram afetadas pela frutose. Esses resultados sugerem que a frutose incubada não está sendo utilizada para a produção de energia, via fosforilação oxidativa, em células endoteliais. Isso pode ser justificado pela baixa velocidade de conversão da frutose à frutose-1-P pela isoforma extra-hepática da frutoquinase.

5.5. EFEITOS AGUDOS X CRÔNICOS DA FRUTOSE

A sobrecarga crônica com frutose induz alterações vasculares que envolvem a redução do relaxamento dependente do endotélio (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; NYBY et al., 2007; ROMANKO et al., 2009; TAKAGAWA et al., 2001), e aumento da contração (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; ROMANKO et al., 2009). O exato mecanismo pelo qual o consumo de frutose leva a esses efeitos ainda não foi elucidado mas alguns artigos têm associado ao aumento da produção de EROs (NYBY et al., 2007; ROMANKO et al., 2009), de prostanoídes vasoconstritores (PUYÓ et al., 2009), da ação da angiotensina II (NYBY et al., 2007) e da ação da endotelina (JUAN et al., 1998) sobre o músculo liso vascular. Todos esses estudos também observaram alterações metabólicas como aumento dos níveis de insulina e triglicerídeos no sangue, além de aumento da pressão arterial, que podem contribuir para a disfunção vascular. Assim, não é possível separar os efeitos diretos da frutose dos efeitos decorrentes de seu metabolismo. Nossos resultados mostram claramente que a frutose exerce um efeito direto sobre os vasos sanguíneos, causando disfunção endotelial. Além disso, os efeitos observados após exposição in

vitro à frutose guardam semelhanças com os efeitos vasculares induzidos pela dieta crônica com frutose.

6. CONCLUSÃO

Os efeitos da dieta com alta frutose sobre o sistema cardiovascular têm sido estudados em modelos animais e humanos (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; JALAL et al., 2010; MADERO et al., 2011; SLYPER, 2013). Entretanto, muitos desses estudos relacionam as alterações vasculares com outros efeitos decorrentes do metabolismo da frutose, como hiperuricemia (NAKAGAWA et al., 2006), hipertrigliceridemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia (EL-BASSOSSY; DSOKEY; FAHMY, 2014; TAKAGAWA et al., 2001).

Nossos resultados demonstraram que a exposição aguda à frutose induz aumento do estresse oxidativo via ativação excessiva da NADPH oxidase, o que aumenta a produção de ânion superóxido e, conseqüentemente, a degradação de NO, culminando em aumento da reatividade à fenilefrina e redução do relaxamento induzido pela acetilcolina. Além disso, o aumento da reatividade vascular à fenilefrina e redução do relaxamento à acetilcolina é influenciada pelo peróxido de hidrogênio (Figura 20). Assim, o desequilíbrio de agentes vasoativos, em especial as espécies reativas de oxigênio, pode ser o mecanismo chave pelo qual a frutose induz respostas vasoconstritoras agudas e pode explicar as alterações vasculares observadas após a ingestão de frutose. Nosso estudo apresenta fortes evidências de que a frutose afeta diretamente os vasos sanguíneos, causando disfunção vascular.

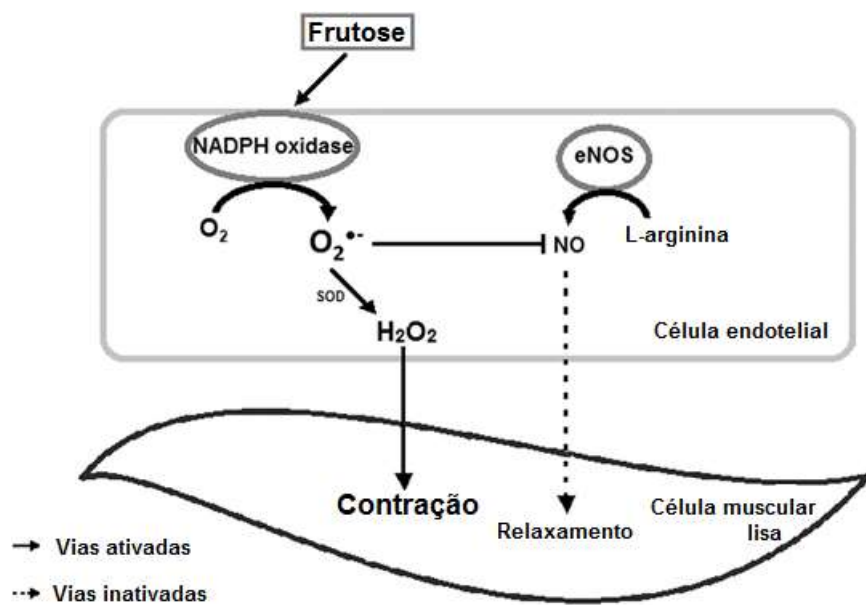


Figura 20. Resumo gráfico dos efeitos da exposição in vitro à frutose sobre a reatividade vascular de aorta isolada.

7. REFERÊNCIAS

- ADMIRAAL, P. J. et al. Metabolism and production of angiotensin I in different vascular beds in subjects with hypertension. **Hypertension**, v. 15, n. 1, p. 44–55, 1990.
- ASSY, N. et al. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. **Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie**, v. 22, n. 10, p. 811–6, out. 2008.
- BALLINGER, S. W. et al. Mitochondrial integrity and function in atherogenesis. **Circulation**, v. 106, n. 5, p. 544–9, 30 jul. 2002.
- BERTOLUCI, M. et al. Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. **World Journal of Diabetes** 2015, v. 6, n. 5, p. 679–692, 2015.
- BISMUT, H.; HERS, H. G.; VAN SCHAFTINGEN, E. Conversion of fructose to glucose in the rabbit small intestine. A reappraisal of the direct pathway. **European journal of biochemistry**, v. 213, n. 2, p. 721–6, 15 abr. 1993.
- BRAY, G. A.; NIELSEN, S. J.; POPKIN, B. M. **Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity** American Journal of Clinical Nutrition, 2004.
- BROWN, C. M. et al. Fructose ingestion acutely elevates blood pressure in healthy young humans. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 294, p. 730–737, 2008.
- CAI, H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: Origins, mechanisms, and consequences. **Cardiovascular Research**, v. 68, n. 1, p. 26–36, 1 out. 2005.
- CHICCO, A. et al. Multiphasic Metabolic Changes in the Heart of Rats Fed a Sucrose-Rich Diet. **Hormone and Metabolic Research**, v. 26, n. 9, p. 397–403, 14 set. 1994.
- COHEN, R.; ADACHI, T. Nitric-Oxide-Induced Vasodilatation: Regulation by Physiologic S-Glutathiolation and Pathologic Oxidation of the Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 4, p. 109–114, maio 2006.
- COSTEROUSSÉ, O. et al. [Angiotensin converting enzyme (kininase II). Molecular and physiological aspects]. **Comptes rendus des seances de la Societe de biologie et**

de ses filiales, v. 186, n. 6, p. 586–98, 1992.

DAI, S.; MCNEILL, J. H. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 33, n. 2, p. 101–107, 1995.

DELBOSC, S. et al. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. **Atherosclerosis**, v. 179, n. 1, p. 43–49, 2005.

DORNAS, W. C. et al. Health Implications of High-Fructose Intake. v. 1, p. 729–737, 2015.

DOROUDI, R. et al. Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 269, n. 1, p. 257–64, 5 mar. 2000.

DOUARD, V.; FERRARIS, R. P. The role of fructose transporters in diseases linked to excessive fructose intake. **The Journal of physiology**, v. 591, n. Pt 2, p. 401–14, 2013.

EL-BASSOSSY, H. M.; DSOKEY, N.; FAHMY, A. Characterization of vascular complications in experimental model of fructose-induced metabolic syndrome. **Toxicology mechanisms and methods**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2014.

EMMERSON, B. T. Effect of oral fructose on urate production. **Ann. rheum. Dis**, v. 33, p. 276–280, 1974.

ENDO, M. Y. et al. Acute responses of regional vascular conductance to oral ingestion of fructose in healthy young humans. **Journal of physiological anthropology**, v. 33, n. 1, p. 11, 17 maio 2014.

FEINMAN, R. D.; FINE, E. J. Fructose in perspective. **Nutrition & Metabolism**, v. 10, p. 1, 2013.

FÉLÉTOU, M.; HUANG, Y.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, n. 3, p. 894–912, 2011.

FÉLÉTOU, M.; VANHOUTTE, P. M. EDHF: an update. **Clinical science (London,**

England : 1979), v. 117, n. 4, p. 139–155, 2009.

FOX, I. H.; KELLEY, W. N. Studies on the mechanism of fructose-induced hyperuricemia in man. **Metabolism**, v. 21, n. 8, p. 713–721, 1972.

FRÖLICH, J. C.; FÖRSTERMANN, U. Role of eicosanoids in regulation of vascular resistance. **Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research**, v. 19, p. 211–5, 1989.

FUNK, C. D.; FITZGERALD, G. A. COX-2 Inhibitors and Cardiovascular Risk. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 50, n. 5, p. 470–479, nov. 2007.

FURCHGOTT, R. F. Role of Endothelium in Responses of Vascular Smooth Muscle. **Circulation Research NOVEMBER An Official Journal of the American Heart Association**, v. 53, n. 5, p. 557–73, 1983.

GBD 2013 MORTALITY AND CAUSES OF DEATH COLLABORATORS, I. FOR H. M. AND et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet (London, England)**, v. 385, n. 9963, p. 117–71, 10 jan. 2015.

GRIENDLING, K. K.; SORESCU, D.; USHIO-FUKAI, M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. **Circulation research**, v. 86, n. 5, p. 494–501, 17 mar. 2000.

HANOVER, L. M.; WHITE, J. S. Manufacturing, composition, and applications of fructose. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 58, n. 5 SUPPL., 1993.

HUI, H. et al. Direct spectrophotometric determination of serum fructose in pancreatic cancer patients. **Pancreas**, v. 38, n. 6, p. 706–12, ago. 2009.

HWANG, I. S. et al. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 10, n. 5, p. 512–6, nov. 1987.

ISHIMOTO, T. et al. Opposing effects of fructokinase C and A isoforms on fructose-induced metabolic syndrome in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4320–4325, 13 mar. 2012.

JALAL, D. I. et al. Increased Fructose Associates with Elevated Blood Pressure. p. 1543–1549, 2010.

JUAN, C. et al. Overexpression of vascular endothelin-1 and endothelin-A receptors in a fructose-induced hypertensive rat model. v. 1, p. 1775–1782, 1998.

KASSAB, A.; PIWOWAR, A. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes. **Biochimie**, v. 94, n. 9, p. 1837–1848, set. 2012.

KLEIN, A. V; KIAT, H. The mechanisms underlying fructose-induced hypertension: a review. **J. Hypertens.**, v. 33, n. 5, p. 912–920, 2015.

KOEPPEN, B. **Berne e Levy Fisiologia**. 6a. ed. [s.l.] Elsevier Brasil, 2011.

KURTZ, T. W. et al. Liquid-chromatographic measurements of inosine, hypoxanthine, and xanthine in studies of fructose-induced degradation of adenine nucleotides in humans and rats. **Clinical Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 782–786, 1986.

LE, K.-A. et al. Fructose overconsumption causes dyslipidemia and ectopic lipid deposition in healthy subjects with and without a family history of type 2 diabetes. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 1760–1765, 1 jun. 2009.

LÊ, K.-A. et al. A 4-wk high-fructose diet alters lipid metabolism without affecting insulin sensitivity or ectopic lipids in healthy humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 84, n. 6, p. 1374–9, dez. 2006.

LI, W. G. et al. H₂O₂-induced O₂ production by a non-phagocytic NAD(P)H oxidase causes oxidant injury. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 31, p. 29251–6, 3 ago. 2001.

LOPERENA, R.; HARRISON, D. G. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 1, p. 169–193, jan. 2017.

MADERO, M. et al. Dietary fructose and hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 13, n. 1, p. 29–35, 2011.

MARDINI, I. A.; FITZGERALD, G. A. Selective inhibitors of cyclooxygenase-2: a growing class of anti-inflammatory drugs. **Molecular interventions**, v. 1, n. 1, p. 30–8, abr. 2001.

MIATELLO, R. et al. Aortic smooth muscle cell proliferation and endothelial nitric oxide synthase activity in fructose-fed rats. **American journal of hypertension**, v. 14, n. 11 Pt 1, p. 1135–41, nov. 2001.

MONCADA, S. et al. Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of

the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. **Thrombosis Research**, v. 11, n. 3, p. 323–344, 1977.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 43, n. 2, p. 109–42, jun. 1991.

MONTEZANO, A. C.; TOUYZ, R. M. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function - Role of Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Nox Family Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidases. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 110, n. 1, p. 87–94, jan. 2012.

MORENO, J. A.; HONG, E. A single oral dose of fructose induces some features of metabolic syndrome in rats: role of oxidative stress. **Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD**, v. 23, n. 6, p. 536–42, jun. 2013.

MORITA, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 68–69, p. 165–75, ago. 2002.

MOZAFFARIAN, D. et al. **AHA Statistical Update Heart Disease and Stroke Statistics — 2016 Update A Report From the American Heart Association WRITING GROUP MEMBERS**. [s.l.: s.n.].

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 1, p. 1–13, 1 jan. 2009.

MURRAY, R. K. et al. **Bioquímica ilustrada de Harper (Lange)**. 29. ed. [s.l.] AMGH, 2013.

NAKAGAWA, T. et al. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 290, p. 625–631, 2006.

NYBY, M. D. et al. Vascular Angiotensin Type 1 Receptor Expression Is Associated with Vascular Dysfunction, Oxidative Stress and Inflammation in Fructose-Fed Rats. **Hypertension Research**, v. 30, n. 5, p. 451–457, maio 2007.

OUYANG, X. et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 6, p. 993–999, jun. 2008.

Oxidative Phosphorylation - Biology - OpenStax CNX. Disponível em: <http://cnx.org/contents/GFy_h8cu@9.85:7oTVAgrZ@7/Oxidative-Phosphorylation>.

Acesso em: 27 fev. 2017.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. **Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine.** *Nature*, 1988.

PANTH, N.; PAUDEL, K. R.; PARAJULI, K. Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. **Advances in medicine**, v. 2016, p. 9152732, 2016.

PARKS, E. J. et al. Dietary Sugars Stimulate Fatty Acid Synthesis in Adults 1–3. **The Journal of nutrition**, n. February, p. 1039–1046, 2008.

PEREDO, H. A. et al. Oral treatment and in vitro incubation with fructose modify vascular prostanoid production in the rat. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 26, n. 1, p. 15–20, jan. 2006.

PETERSEN, K. F. et al. Stimulating effects of low-dose fructose on insulin-stimulated hepatic glycogen synthesis in humans. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1263–8, jun. 2001.

PRESTON, G. M.; CALLE, R. A. Elevated Serum Sorbitol and not Fructose in Type 2 Diabetic Patients. **Biomarker insights**, v. 5, p. 33–8, 4 maio 2010.

PRIETO, P. G. et al. Plasma D-glucose, D-fructose and insulin responses after oral administration of D-glucose, D-fructose and sucrose to normal rats. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 414–9, out. 2004.

PUYÓ, A. M. et al. Time course of vascular prostanoid production in the fructose-hypertensive rat. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, v. 29, n. 3, p. 135–139, 2009.

RICHEY, J. M. et al. FRUCTOSE PERFUSION IN RAT MESENTERIC ARTERIES IMPAIRS ENDOTHELIUM-DEPENDENT VASODILATION. **Life Sciences**, v. 62, n. 4, p. PL55-PL62, 1997.

RINCÓN, J. et al. Role of Angiotensin II type 1 receptor on renal NAD(P)H oxidase, oxidative stress and inflammation in nitric oxide inhibition induced-hypertension. **Life sciences**, v. 124, p. 81–90, 1 mar. 2015.

ROMANKO, O. P. et al. Insulin Resistance Impairs Endothelial Function but not Adrenergic Reactivity or Vascular Structure in Fructose-fed Rats. p. 414–423, 2009.

RUBANYI, G. M.; VANHOUTTE, P. M. Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. **The American journal of physiology**, v. 250, n.

5 Pt 2, p. H822-7, maio 1986.

SATOH, K. et al. Dual roles of vascular-derived reactive oxygen species—With a special reference to hydrogen peroxide and cyclophilin A—. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 73, p. 50–56, ago. 2014.

SCHAEFER, E. J.; GLEASON, J. A.; DANSINGER, M. L. Dietary Fructose and Glucose Differentially Affect Lipid and Glucose Homeostasis. **Journal of Nutrition**, v. 139, n. 6, p. 1257S–1262S, 1 jun. 2009.

SEMCHYSHYN, H. M. **Fructation in vivo: Detrimental and protective effects of fructose** **BioMed Research International**, 2013.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 171–176, 15 jul. 2000.

SKEGGS, L. T. et al. The purification of hypertensin I. **The Journal of experimental medicine**, v. 100, n. 4, p. 363–70, 1 out. 1954.

SLYPER, A. H. The influence of carbohydrate quality on cardiovascular disease, the metabolic syndrome, type 2 diabetes, and obesity - an overview. **Journal of pediatric endocrinology & metabolism : JPEM**, v. 26, n. 7–8, p. 617–29, 1 jan. 2013.

SUN, S. Z.; EMPIE, M. W. Fructose metabolism in humans - what isotopic tracer studies tell us. **Nutrition & metabolism**, v. 9, n. 1, p. 89, 2 out. 2012.

SWARBRICK, M. M. et al. Consumption of fructose-sweetened beverages for 10 weeks increases postprandial triacylglycerol and apolipoprotein-B concentrations in overweight and obese women. **The British journal of nutrition**, v. 100, n. 5, p. 947–52, 2008.

TAKAGAWA, Y. et al. Long-term fructose feeding impairs vascular relaxation in rat mesenteric arteries. **American journal of hypertension**, v. 14, n. 8 Pt 1, p. 811–7, ago. 2001.

TANG, E. H. C.; VANHOUTTE, P. M. Gene expression changes of prostanoid synthases in endothelial cells and prostanoid receptors in vascular smooth muscle cells caused by aging and hypertension. **Physiological Genomics**, v. 32, n. 3, p. 409–418, 6 nov. 2007.

TEFF, K. L. et al. Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates

postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2963–72, jun. 2004.

TEFF, K. L. et al. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: Influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1562–1569, 2009.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporters in the 21st Century. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 298, n. 2, p. E141–E145, 1 fev. 2010.

TURNER, J. L. et al. Effect of dietary fructose on triglyceride transport and glucoregulatory hormones in hypertriglyceridemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 32, n. 5, p. 1043–1050, 1979.

VARTANIAN, L. R.; SCHWARTZ, M. B.; BROWNELL, K. D. Effects of soft drink consumption on nutrition and health: a systematic review and meta-analysis. **American journal of public health**, v. 97, n. 4, p. 667–75, abr. 2007.

WAHJUDI, P. N. et al. Measurement of glucose and fructose in clinical samples using gas chromatography/mass spectrometry. **Clinical biochemistry**, v. 43, n. 1–2, p. 198–207, jan. 2010.

WATTANAPITAYAKUL, S. K.; BAUER, J. A. Oxidative pathways in cardiovascular disease: roles, mechanisms, and therapeutic implications. **Pharmacology & therapeutics**, v. 89, n. 2, p. 187–206, fev. 2001.

WHITE, J. S. Challenging the Fructose Hypothesis: New Perspectives on Fructose Consumption and Metabolism. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 4, n. 2, p. 246–256, 1 mar. 2013.

YANAGISAWA, M. et al. A novel peptide vasoconstrictor, endothelin, is produced by vascular endothelium and modulates smooth muscle Ca²⁺ channels. **Journal of hypertension. Supplement: official journal of the International Society of Hypertension**, v. 6, n. 4, p. S188-91, dez. 1988.

YANAI, H. et al. metabolic syndrome. v. 6, p. 1–6, 2008.

8. Anexo